

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Laboratoire de Chimie minérale,
de Chimie analytique et de Microchimie

FACULTÉ DE MÉDECINE
Professeur P.-E. Wenger

Recherches sur le dosage de l'alcool éthylique dans le sang

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences chimiques

par

Werner-Franz RÜEDI
de
LUCERNE

Licencié ès sciences chimiques de l'Université de Genève

Thèse N° 1271

GENÈVE
Editions Médecine et Hygiène
1957

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Laboratoire de Chimie minérale,
de Chimie analytique et de Microchimie

FACULTÉ DE MÉDECINE
Professeur P.-E. Wenger

Recherches sur le dosage de l'alcool éthylique dans le sang

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences chimiques

par

Werner-Franz RÜEDI

de

LUCERNE

Licencié ès sciences chimiques de l'Université de Genève

Thèse No 1271



GENÈVE
Editions Médecine et Hygiène
1957

La faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur Paul-E. Wenger, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 10 juillet 1957.

Le doyen :

Fernand CHODAT

Thèse N° 1271

Que Messieurs les Professeurs P.-E. Wenger et D. Monnier trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour les encouragements et l'intérêt qu'ils ont bien voulu me témoigner au cours de l'élaboration du présent travail.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur le Professeur Linder pour les conseils qu'il m'a donné dans le domaine de la statistique mathématique.

A MES PARENTS ET

A CORNELIA

SOMMAIRE

1.- INTRODUCTION

2.- ETUDE CRITIQUE

21) Généralités

- 211) Méthodes contrôlées
- 212) Procédé
- 213) Solutions aqueuses d'éthanol
- 214) Sang alcoolisé
- 215) Contrôle de la sélectivité
- 216) Calcul d'erreur

22) Méthode Nicloux-directe

- 221) Principe et résumé du mode opératoire
- 222) Titration
- 223) Distillation
- 224) Analyses sur le sang
- 225) Sélectivité
- 226) Conclusions

23) Méthode Rochat

- 231) Principe et résumé du mode opératoire
- 232) Titration
- 233) Distillation
- 234) Analyses sur le sang
- 235) Sélectivité
- 236) Conclusions

24) Méthode Schifferli

- 241) Principe
- 242) Appareillage et dosage
- 243) Dosages de solutions aqueuses d'éthanol
- 244) Analyses sur le sang
- 245) Sélectivité
- 246) Conclusions

25) Méthode ADH (par fermentation)

- 251) Principe et résumé du mode opératoire
- 252) Dosages de solutions aqueuses d'éthanol
- 253) Analyses sur le sérum
- 254) Analyses sur le sang
- 255) Sélectivité
- 256) Conclusions

26) Drunkometer (analyse d'alcool sur l'air d'expiration)

- 261) Principe
- 262) Dosages
- 263) Conclusions

27) Breathalyzer (analyse d'alcool sur l'air d'expiration)

- 271) Principe
- 272) Dosages
- 273) Conclusions

28) Conclusions de l'étude critique

3.- RECHERCHES POUR AMELIORER LE DOSAGE DE L'ETHANOL

31) L'oxydation de l'éthanol par le dichromate

32) Le dosage polarographique de l'éthanol

- 321) Introduction
- 322) Distillation
- 323) Oxydation
- 324) Polarographie
- 325) Précisions
- 326) Réactifs et mode opératoire
- 327) Dosages sur le sang
- 328) Conclusions

33) Le microdosage polarographique

- 331) Introduction
- 332) Microdistillation isothermique
- 333) Oxydation
- 334) Microdiffusion sur des solutions aqueuses d'alcool
- 335) Microdiffusion sur le sang
- 336) Polarographie
- 337) Réactifs et mode opératoire
- 338) Précisions
- 339) Conclusions

34) Le microdosage spectrophotométrique

- 341) Introduction
- 342) Réactifs et mode opératoire
- 343) Mesure spectrophotométrique
- 344) Analyses sur le sang
- 345) Conclusions

4.- CONCLUSIONS FINALES

5.- LITTÉRATURE

1.- I N T R O D U C T I O N

On dose, depuis plus de 100 ans, l'alcool éthylique dans le sang. Un des premiers travaux est celui de Cotte publié en 1852 (1). Cet auteur utilisait déjà le Cr^{+6} comme réactif oxydant. Plusieurs chercheurs ont apporté des modifications (2, 3, 4), mais ce n'est qu'au début de ce siècle, à la suite des travaux de Nicloux (5), que ce dosage est entré peu à peu dans la pratique médico-légale. A l'Institut de médecine légale de Zurich, on l'a introduit en 1924 et deux ans après, à Genève. Depuis les premiers travaux, des publications décrivant des nouvelles méthodes et des modifications ne cessaient d'apparaître. Malgré ces efforts, la valeur de cette analyse, au point de vue diagnostique de l'ivresse, demeurait l'objet de multiples réserves. Ainsi, en 1940, Schwarz et Thélin (6) ont pu écrire : "Il arrive encore souvent que les tribunaux se contentent d'admettre une ivresse légère, soit sans conséquence d'ordre juridique, voire même de la nier, dans des cas où l'analyse chimique du sang ou du cerveau donne des résultats tels que, nécessairement, on doit médicalement admettre une ébriété prononcée". Cet état de chose était dû, en partie, à l'emploi des termes élastiques "ivresse" et "ébriété" et à la variabilité de facteurs individuels comme, par exemple, le degré de tolérance éthylique. Mais, d'autre part, en 1949, RoCHAT (7) a démontré que des "désaccords entre différentes méthodes de détermination de l'alcoolémie" justifient les doutes énoncés. Sept laboratoires suisses qui effectuaient ce dosage depuis des années ont obtenu, pour les mêmes échantillons de sang, des résultats présentant des différences considérables, atteignant 0,50 o/oo au taux de 1 o/oo et 1,0 à 1,3 o/oo aux concentrations plus élevées.

En Allemagne, deux séries de comparaisons dites "essais de Bonn", effectuées par plusieurs instituts en 1953-1954, ont relevé des différences entre les résultats allant jusqu'à 0,94 o/oo (8) et 0,42 lors du 2ème essai (8, 9). Il semble donc

que la situation n'y était guère plus rassurante que chez nous (10).

Vu cet état de chose, nous avons suivi les encouragements de quelques médecins et chimistes intéressés au dosage de l'alcool dans le sang, pour entreprendre le présent travail.

Le but de cette thèse est de contribuer à augmenter la précision et la sécurité de ce dosage. Pour cela, nous avons d'abord examiné les méthodes utilisées en Suisse et ensuite, nous avons cherché des améliorations. Ainsi, cette thèse comprend trois parties :

- 1) Une étude critique des méthodes de dosage d'alcool dans le sang utilisées en Suisse ;
- 2) des recherches pour améliorer cette détermination ;
- 3) une étude comparative de toutes ces méthodes.

2.- ETUDE CRITIQUE

21.- GENERALITES

211) Méthodes contrôlées.-

Nous avons contrôlé les méthodes chimiques suivantes utilisées en Suisse :

Nicloux-directe(mod. Naville), Rochat, Schifferli, Fermentation, Drunkometer et Breathalyzer. En Suisse, les trois dernières n'ont été utilisées jusqu'à présent qu'à titre d'essais. Nous n'avons pas expérimenté la méthode interférométrique, notre institut ne possédant pas d'instrument adéquat.

La méthode Widmark est utilisée - et ce dernier temps de nouveau contrôlée - par les instituts allemands. Comme on ne la pratique guère dans notre pays, nous ne nous en sommes pas occupés.

212) Procédé.-

a) Nous nous sommes rendus, tout d'abord, dans les différents instituts, ce qui nous a permis d'étudier leurs méthodes sur place. Lors de ces visites, nous avons constaté que la méthode Nicloux-directe est pratiquée par la plupart des laboratoires, mais selon différentes modifications. Nous ne nous occuperons dans ce travail que de la modification simplifiée de Naville.

b) Nous avons installé les appareils nécessaires dans notre laboratoire et préparé les réactifs selon les prescriptions des auteurs. Une première série d'une vingtaine d'analyses nous servait de mise au point. Leurs résultats ont été écartés.

c) Après cette documentation et introduction, nous avons effectué des séries d'essais sur des solutions aqueuses de teneur connue en éthanol. Pour obtenir le plus de renseignements, nous avons scindé les méthodes en opérations fondamentales. Les méthodes de Nicloux et de Rochat, par exemple, s'effectuent en deux stades principaux : la distillation et le titrage que nous avons donc étudiés séparément.

Dans tous les cas, il a été fait un grand nombre d'analyses, par deux ou trois analystes différents, afin de déterminer le coefficient personnel (important spécialement dans le cas du titrage). Les tableaux publiés dans ce travail contiennent les résultats obtenus lors des dernières séries d'essais.

d) Pour chaque méthode, nous avons effectué une série d'analyses complètes de sang renfermant des quantités connues d'éthanol (ajouté in vitro et in vivo).

e) Pour vérifier la sélectivité des méthodes, nous avons effectué des analyses en présence de corps étrangers susceptibles de gêner le dosage de l'alcool (plus particulièrement l'acétone).

f) Chaque série d'analyses a été contrôlée par des calculs des déviations et des erreurs. Nous avons déterminé l'écart type et les limites de confiance 1 % dans le cas de l'analyse complète dans le sang.

g) Nous avons comparé toutes ces méthodes entre elles et avec nos nouveaux procédés physico-chimiques (voir Chap.4).

213) Solutions aqueuses d'éthanol.-

Nous exprimons les concentrations des solutions (de même que tous les résultats) en o/oo poids (g/Kg). Pour la préparation de nos solutions standards d'alcool, nous avons examiné les deux méthodes suivantes :

a) Par hydrolyse du chlorhydrate éthyle-glycocollate.- (Aethylum glycocollatum hydrochloricum Merck 893). Dissoudre à la température de la chambre 0,303 g. de cet ester dans 10,0 ml. d'une solution NaOH 2 N. Laisser reposer 10 minutes. Utiliser sans attendre cette solution à 10 o/oo pour préparer les solutions à concentrations différentes.

b) Par pesée de l'alcool éthylique absolu.- On introduit dans un ballon de 25 ml. environ 10 ml. d'eau bidistillée. On pèse et introduit ensuite 10 g. d'alcool éthylique absolu (env. 12,65 ml.). On repèse immédiatement et transvase le contenu dans

un ballon jaugé de 1 lt. On complète par de l'eau bidistillée. Ainsi, on obtient une solution d'alcool de 10 o/oo qui se prête aux dilutions ultérieures.

La méthode par pesée de l'alcool s'est révélée préférable à cause de la plus grande stabilité de la solution. Les solutions de 1 o/oo gardées au frigidaire à 4° C. dans des flacons à bouchons rodés restent stables pendant plus d'un mois. Pour deux échantillons d'une solution aqueuse de 1,00 o/oo d'éthanol que nous avons gardés dans ces conditions pendant 6 mois, nous avons trouvé des teneurs de 0,97 et 0,98 o/oo.

Nous avons utilisé l'alcool éthylique pro anal. Merck No 972 et pour la seconde partie de nos travaux, l'alcool absolu de la Régie fédérale des alcools qui présente selon leur analyse No Ch. 224a les caractéristiques suivantes : Teneur min. 99,7 o/o(poids) ; furfurol : 0 ; aldéhyde : max. 0,06 o/oo (vol.) ; acide : max. 0,02 g./l. ; ester : max. 0,15 g./l. ; alcool méthylique : max. 0,5 o/oo (vol.) ; extrait : max. 0,01 g./l. avec cet alcool, nous avons préparé des solutions aqueuses de 1 o/oo dont les différences des teneurs ne dépassaient pas $\pm 0,3\%$.

214) Sang alcoolisé.-

Pour l'étude de l'analyse complète, nous avons utilisé des échantillons de sang alcoolisé in vitro et in vivo. Pour le mélange in vitro, nous avons prélevé du sang à des personnes n'ayant pas consommé d'alcool depuis 24 heures au moyen de veintubes de 10 ml. contenant 0,10 gr. de NaF. Seuls des échantillons sans coagulation, même partielle, ont été alcoolisés par les solutions d'éthanol mentionnées ci-dessus. La répartition uniforme de l'alcool a été effectuée par agitation dans des tubes refroidis à la glace. Nous avons utilisé le même jour les prises de sang ainsi préparées. Il est très important que le sang prélevé et fluoré soit immédiatement secoué pendant 2 à 3 minutes, sans quoi, on observe malgré le fluorure une formation de petits caillots qui restent en suspension et peuvent fausser le résultat de l'analyse. Plus la quantité prélevée est faible, plus l'erreur est grande.

Nous avons contrôlé le sang avant l'addition de l'alcool. Tous les échantillons présentaient des valeurs à blanc inférieures à 0,02 o/oo, exprimées en éthanol (méthode Rochat).

Les résultats indiqués dans les tableaux 13, 14, 23 et 25 ont été obtenus sur des échantillons de sang alcoolisés in vivo, fournis par la Police. Pour ceux contenus dans les

tableaux 15 à 17, des personnes à jeun d'alcool ont accepté de boire dans notre laboratoire des boissons à teneur en alcool et en quantité connues. Leur sang et leur haleine ont été soumis à l'analyse (voir Chap. 27 et 28).

215) Contrôle de la sélectivité.-

Pour juger la sélectivité, nous nous basons sur l'ensemble du procédé d'analyse et non seulement sur la réaction entre le réactif et l'éthanol (p. ex. oxydation ou fermentation). Ainsi, il serait inexact de dire que l'analyse par oxydation au dichromate est sans aucune spécificité. Ce dosage commence par une distillation (év. avec fractionnement) en milieu acide picrique. De ce fait, seuls les corps non basiques qui distillent à peu près à la même température que l'alcool dans ces conditions, pourraient gêner le dosage. Mais cela seulement à condition que leur pouvoir réducteur (qui est fonction de la concentration et du potentiel) soit semblable ou plus grand que celui de l'éthanol dans les concentrations de l'analyse. Le corps gênant le plus souvent invoqué devant les tribunaux est l'acétone. Nous étudierons en détail les questions de la sélectivité des différentes méthodes dans un travail ultérieur.

216) Calcul d'erreur.-

Vu les conséquences graves que peut entraîner le dosage de l'alcool dans le sang, nous ne nous bornerons pas à calculer l'écart type et des limites de confiance (p. ex. 1 %), mais nous indiquerons en plus les déviations et erreurs pour chaque valeur. L'ensemble de ces indications nous permettra de juger les méthodes avec plus de discernement. Nous donnons ci-dessous un exemple du calcul adopté pour ce travail.

Supposons que le dosage d'une solution d'alcool 1,00 o/oo (en poids) ait donné les résultats suivants : 1,02, 1,01, 1,03, 1,00, 1,04

X_i			Y_i
Résult. théor.	Résultats obs.	Déviations ou écarts	Erreurs
1,00	1,02	0,00	+ 0,02
1,00	1,01	0,01	+ 0,01
1,00	1,03	0,01	+ 0,03
1,00	1,00	0,02	0,00
1,00	<u>1,04</u>	<u>0,02</u>	+ 0,04
	<u>5,10</u>	<u>0,06</u>	

Résultat moyen :

Ecart moyen :

$$\frac{5,10}{5} = \underline{1,02}$$

$$\underline{0,012}$$

Ecart moyen relatif en % :

$$\frac{0,012 \cdot 100}{1,02} = \underline{1,18 \%}$$

Ce chiffre exprime la fidélité ou précision de la méthode, c'est-à-dire la dispersion autour d'une valeur moyenne (1,02 o/oo). Cette dernière n'est évidemment pas la valeur exacte de la teneur en alcool qui est de 1,00 o/oo.

L'erreur moyenne absolue est donnée par la différence entre la valeur moyenne obtenue au cours des analyses et la valeur théorique soit :

$$\underline{1,02 - 1,00 = + 0,02}$$

Ce dernier chiffre exprime l'exactitude de la méthode. On donne souvent l'erreur moyenne relative (en %) :

$$\frac{0,02 \cdot 100}{1,00} = \underline{+ 2 \%}$$

Pour les analyses complètes, nous avons procédé en plus à un calcul statistique (11) :

Pour chaque résultat (entre 0,5 et 2 o/oo), nous avons calculé le rapport $Z_i = \frac{Y_i}{X_i}$ et la valeur de Z_i^2 .

N étant le nombre d'essais, on en peut tirer la valeur moyenne de Z_i :

$$\frac{\sum_{i=1}^N Z_i}{N} = \bar{Z} \quad (\text{exprime l'exactitude})$$

L'écart quadratique moyen (variance) est calculé selon la formule

$$S_z^2 = \frac{1}{N - 1} \left(\sum_{i=1}^N Z_i^2 - \frac{\left[\sum_{i=1}^N Z_i \right]^2}{N} \right)$$

d'où l'on tire
$$S_Z = \sqrt{S_Z^2}$$

C'est l'écart type (= déviation standard) qui exprime la précision.

En admettant la répartition de t , on peut calculer pour chaque méthode les limites de confiance à 1 %.

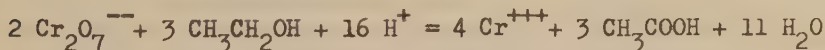
$$\text{Limites de conf.} = \bar{Z} \pm t_{0,01} \cdot S_Z \text{ (voir chap. 4).}$$

Ces limites déterminent l'intervalle dans lequel nous pouvons nous attendre à trouver 99 % des résultats.

22.- METHODE NICLOUX-DIRECTE

221) Principe et résumé du mode opératoire.-

Cette méthode comprend 2 parties : la distillation du sang en présence d'acide picrique et le titrage volumétrique de l'alcool du distillat. Ce titrage est basé sur la réaction d'oxydo-réduction au cours de laquelle l'éthanol est oxydé par une solution de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) de titre connu, selon l'équation :



L'ion Cr^{+++} provenant de la réduction du bichromate par l'alcool colore la solution en vert. Un excès de bichromate jaune fait passer la coloration du vert au jaune-vert et marque ainsi la fin de la réaction. Le titrage se fait au voisinage du point d'ébullition qui est à 140° environ.

Cette méthode est utilisée dans plusieurs laboratoires de notre pays. Elle a subi de nombreuses modifications portant principalement sur la concentration de la sol. de dichromate, la technique de la distillation et du titrage.

La réaction entre le dichromate et l'éthanol n'est pas rigoureusement stoechiométrique. Elle est modifiée par la concentration en acide, par la température et par des impuretés qui peuvent catalyser une oxydation en aldéhyde ou en CO_2 .

La concentration du réactif, et avec cela l'équivalence dichromate / 5 ml. d'éthanol admise, varie selon les auteurs de 16,97 à 20,30 gr./lt. (voir chap. 31). Dans certains instituts, on distille à l'aide d'un appareil spécial sous pression réduite, bien que l'auteur de ce procédé (Schwarz) y a lui-même renoncé après avoir observé des pertes sensibles en alcool.

Nous avons retenu pour notre étude critique la modification de Naville, telle qu'elle était pratiquée à Genève (12) : distillation dans un appareil sans rodages constitué d'un ballon de 500 ml. à col haut, surmonté d'une colonne de Vigreux. Les vapeurs d'alcool et d'eau sont condensées dans un réfrigérant de verre et reçues dans un cylindre gradué de 50 ml. Pour les détails des modes opératoires selon les différentes modifications, nous renvoyons aux travaux suivants : (12, 13, 14, 5).

Pour vérifier la méthode Nicloux, nous avons effectué, tout d'abord, l'étude du titrage sur des solutions aqueuses d'alcool de teneur connue, puis celle de la distillation avec une colonne de Vigreux et enfin, nous avons effectué les analyses complètes sur le sang.

222) La titration.—

Cette titration a été effectuée sur des solutions aqueuses d'alcool préparées au moyen de l'alcool absolu selon chap. 213. Elle a été entreprise par 3 chimistes différents que nous désignerons par les lettres A, B, C.

Remarque : Pour tous les essais sur des solutions aqueuses d'alcool, les valeurs de la première colonne des tableaux ne correspondent pas à la concentration en alcool lors du titrage ; mais à celle qu'aurait le sang lors du prélèvement, en admettant que l'analyse se fasse sur 10 g. de ce liquide, que la distillation donne 35 ml. de ce distillat et que le titrage s'effectue sur une partie aliquote de 5 ml. Par exemple, pour une valeur réelle de 1,0 o/oo, nous avons :

dans 10 g. de sang - 10 mg. d'éthanol - qui correspondent à
35 ml. de distillat
5 ml. de distillat - 1,421 mg. d'éthanol.

Le titrage, pour la concentration de 1,0 o/oo s'effectue donc sur 5 ml. d'une solution renfermant 1,421 mg. d'alcool.

Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux 1, 2 et 3.

Plus de dix chimistes ont participé à ces essais, nous n'avons donné, dans les tableaux précédents qu'une partie des résultats obtenus. De l'avis de tous, le titrage est délicat, le changement de la couleur de la solution (du vert au vert-jaune) n'est pas facile à observer, même en présence d'un étalon coloré, le point de virage est difficile à déterminer de façon exacte. Les causes d'erreurs sont nombreuses. Elles proviennent principalement de l'éclairage, de la sensibilité visuelle très différente d'un chimiste à l'autre, de la fatigue et du fait que le changement de teinte n'est pas le même aux différentes concentrations d'alcool, ce qui rend l'emploi d'un étalon coloré peu efficace. D'autre part, il y a des pertes en alcool lors de l'ébullition et on observe la formation de petites quantités d'aldéhyde acétique, ce qui devrait provoquer des erreurs par défaut, alors que, dans presque tous les cas, les résultats obtenus sont trop forts. Il faut en rechercher l'origine dans l'excès de réactif qu'on doit ajouter pour percevoir le virage, dans le fait que la réaction n'est pas stoechiométrique et qu'une partie de l'alcool est oxydé en gaz carbonique.

L'emploi de filtres et de lampes colorés pour l'observation du point de virage à l'oeil n'a pas amélioré les résultats et nous avons préféré travailler à la lumière du jour. La solution de dichromate présente un maximum d'absorption à env. 350 nm, celle du chrome III présente une absorption entre 500 et 700 nm avec un maximum autour de 600 nm. Le fait qu'entre 400 et 500 nm les deux formes du chrome absorbent rend difficile la détermination du point de virage.

Les écarts moyens relatifs varient de 0,43 o/o à 6,15 o/o. Les erreurs moyennes relatives varient de - 2,9 % à + 68 % et les erreurs extrêmes constatées ont atteint - 9 % et + 76 % (voir tableaux 1, 2 et 3).

Cette titration est cependant beaucoup plus précise et exacte aux environs de la concentration critique de 1 o/oo d'alcool. Pour des teneurs d'alcool comprises entre 0,8 et 1,5 o/oo, nous avons constaté les écarts moyens relatifs : de 0,47 % à 2,76 % ; les erreurs moyennes relatives : de + 4 % à + 18 % et les erreurs extrêmes : de + 0,5 % à + 21 %.

Il est important que l'acide sulfurique soit exempt de matière réductrice. Nous avons constaté que certains acides sulfuriques purs "pro anal" présentaient un pouvoir réducteur non négligeable. La méthode Nicloux ne prévoit pas de contrôle de cet acide. Il est indispensable pourtant d'établir dans chaque cas un facteur de correction, afin d'éviter des er-

reurs qui peuvent être très importantes.

Pour le calcul de la concentration de l'alcool dans le sang, nous avons utilisé le facteur généralement utilisé (Schwarz et coll., 13) qui admet que 4,30 mg. de $K_2Cr_2O_7$ oxydent 1 mg. d'éthanol. Pour les autres facteurs d'équivalence, dichromate / alcool, voir chap. 323.

TABEAU 1

Méthode Nicloux-directe : titrage de sol. aq. d'alcool.

Analyste A.-

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens abs.	Ecart moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m. rel. %	Erreurs extrêmes %
0,100	0,159	0,009	0,168	0,0063	3,76	+0,068	+ 68,0	(+ 59
0,100	0,170	0,002						+ 76
0,100	0,176	0,008						(+ 11
0,200	0,239	0,002	0,237	0,0067	2,81	+0,037	+ 18,5	+ 20
0,200	0,222	0,015						(+ 3,2
0,200	0,240	0,003						+ 10
0,500	0,540	0,002	0,538	0,0094	1,75	+0,038	+ 7,6	(+ 3
0,500	0,550	0,012						+ 10
0,500	0,540	0,002						(+ 3
0,500	0,516	0,022						+ 6,3
0,500	0,547	0,009						(+ 4,9
0,800	0,833	0,001	0,832	0,0078	0,938	+0,032	+ 4,0	+ 7,0
0,800	0,826	0,006						(+ 4,2
0,800	0,850	0,018						+ 8,4
0,800	0,825	0,007						(+ 2,8
0,800	0,825	0,007						+ 8
1,000	1,055	0,003	1,058	0,006	0,568	+0,058	+ 5,8	(+ 5
1,000	1,049	0,009						+ 6,5
1,000	1,070	0,012						(+ 4,2
1,000	1,055	0,003						+ 8,4
1,000	1,061	0,003						(+ 2,8
1,200	1,295	0,012	1,283	0,0143	1,112	+0,083	+ 6,9	+ 8
1,200	1,300	0,017						(+ 4,2
1,200	1,250	0,033						+ 8,4
1,200	1,280	0,003						(+ 2,8
1,200	1,290	0,007						+ 8
1,800	1,940	0,050	1,890	0,024	1,27	+0,090	+ 5,0	(+ 5
1,800	1,850	0,040						+ 6,5
1,800	1,900	0,010						(+ 4,2
1,800	1,880	0,010						+ 8,4
1,800	1,880	0,010						(+ 2,8
2,000	2,130	0,018	2,112	0,0123	0,585	+0,112	+ 5,6	+ 8
2,000	2,100	0,012						(+ 5
2,000	2,105	0,007						+ 6,5

TABLEAU 2

Méthode Nicloux-directe : titrage de sol. aq. d'alcool

Analyste B.-

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolu	Résultats moyens	Ecart moyen abs.	Ecart moyen relat.	Erreurs m. abs.	Erreurs m. rel. %	Erreurs extrêmes %
0,100	0,112	0,003	0,115	0,0066	5,74	+0,015	+ 15	+ 2
0,100	0,102	0,013						+ 28
0,100	0,128	0,013						
0,100	0,116	0,001						
0,100	0,118	0,003						
0,500	0,548	0,009	0,539	0,0062	1,15	+0,039	+ 7,8	+ 4
0,500	0,540	0,001						+ 10
0,500	0,539	0,000						
0,500	0,541	0,002						
0,500	0,520	0,019						
0,800	0,809	0,038	0,847	0,0146	1,72	+0,047	+ 5,87	+ 1,1
0,800	0,866	0,019						+ 8,3
0,800	0,852	0,005						
0,800	0,843	0,004						
0,800	0,854	0,007						
1,000	1,043	0,003	1,046	0,0106	1,01	+0,046	+ 4,6	+ 2,1
1,000	1,067	0,021						+ 6,7
1,000	1,062	0,016						
1,000	1,021	0,025						
1,000	1,038	0,008						
1,500	1,591	0,005	1,596	0,044	2,76	+0,096	+ 6,4	+ 0,5
1,500	1,580	0,016						+ 13,4
1,500	1,602	0,006						
1,500	1,701	0,105						
1,500	1,508	0,088						
2,000	2,108	0,009	2,117	0,009	0,43	+0,117	+ 5,86	+ 5,4
2,000	2,125	0,008						+ 6,6
2,000	2,132	0,015						
2,000	2,117	0,000						
2,000	2,104	0,013						

TABEAU 3

Méthode Nicloux-directe : titrage de sol. aq. d'alcool

Analyste C.-

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens abs.	Ecart moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.rel. %	Erreurs extrêmes %
0,100	0,110	0,006	0,116	0,0054	4,66	+0,016	+ 16	(+ 9 + 24
0,100	0,109	0,007						
0,100	0,120	0,004						
0,100	0,118	0,002						
0,100	0,124	0,008						
0,500	0,530	0,000	0,530	0,0084	1,59	+0,030	+ 6	(+ 2 + 8,4
0,500	0,542	0,012						
0,500	0,532	0,002						
0,500	0,510	0,020						
0,500	0,538	0,008						
0,800	0,850	0,004	0,854	0,0052	0,61	+0,054	+ 6,75	(+ 6 + 7,8
0,800	0,862	0,008						
0,800	0,847	0,007						
0,800	0,859	0,005						
0,800	0,852	0,002						
1,000	1,065	0,009	1,056	0,0050	0,47	+0,056	+ 5,6	(+ 4,9 + 6,5
1,000	1,057	0,001						
1,000	1,062	0,006						
1,000	1,049	0,007						
1,000	1,058	0,002						
1,500	1,820	0,050	1,770	0,0412	2,31	+ 0,27	+ 18	(+ 14 + 21
1,500	1,732	0,038						
1,500	1,704	0,066						
1,500	1,792	0,022						
1,500	1,801	0,031						
3,000	2,729	0,184	2,913	0,1792	6,15	-0,087	- 2,9	(+ 0,4 - 9
3,000	2,750	0,163						
3,000	3,013	0,100						
3,000	3,260	0,347						
3,000	2,811	0,102						

TABLEAU 4

Distillation avec colonne de Vigreux de sol. aq. d'alcool.

Titration selon Rochat.

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens abs.	Ecart moyens relat.	Erreurs m. abs.	Erreurs m. rel. %
0,500	0,510	0,017	0,493	0,011	2,24	-0,007	- 1,4
0,500	0,480	0,013					
0,500	0,490	0,003					
0,800	0,806	0,002	0,808	0,002	0,25	+0,008	+ 1,0
0,800	0,810	0,002					
1,000	1,020	0,012	1,008	0,012	1,11	+0,008	+ 0,8
1,000	0,996	0,012					
1,800	1,770	0,003	1,773	0,014	7,9	-0,027	- 1,5
1,800	1,794	0,021					
1,800	1,756	0,017					
2,000	1,940	0,010	1,950	0,010	0,5	-0,050	- 2,5
2,000	1,960	0,010					

223) La distillation.-

Avant le titrage, on sépare l'alcool du sang par distillation. Plusieurs dispositifs ont été adoptés. Le plus perfectionné nous semble celui proposé par Rochat (15) et repris par Wehrli (14).

Nous nous sommes bornés au procédé de distillation employé dans la modification utilisée à Genève et décrite dans le chap. 221.

Pour ce contrôle, nous avons titré l'alcool du distillat par la méthode Rochat, celle-ci, comme nous le verrons plus loin, est plus précise et plus exacte que la méthode Nicloux-directe ou ses diverses modifications. Nous avons distillé des solutions aqueuses d'alcool préparées comme précédemment par dilution d'alcool absolu.

Si la distillation est effectuée lentement (30 à 40 minutes), les erreurs moyennes relatives ne dépassent pas $\pm 2,5\%$ y compris l'erreur de titration selon Rochat (voir tableau 4). Ce dispositif ne se prête pas aux distillations rapides (10 à 15 minutes) pour lesquelles nous avons constaté des pertes d'alcool allant jusqu'à $- 10\%$.

224) L'analyse complète sur le sang.-

Nous avons effectué des analyses sur des échantillons de sang alcoolisé in vitro (voir chap. 214).

Pour empêcher la formation de mousse, nous avons ajouté pour 10 gr. de sang, 65 à 70 ml. d'une solution d'acide picrique à 0,85 %. Cette solution acide a été purifiée par ébullition prolongée avant l'emploi, afin d'éliminer les réducteurs volatiles.

TABIEAU 5

Distillation avec colonne de Vigreux et titrage Nicloux-directe:
sang alcoolisé in vitro.

Valeurs	Valeurs trouvées	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens abs.	Ecart moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.rel. %	Erreurs extrêmes %
0,400	0,475	0,010	0,485	0,0066	1,36	+0,085	+ 21,0	19
0,400	0,490	0,005						22
0,400	0,490	0,005						
1,200	1,340	0,023	1,317	0,024	1,83	+0,117	+ 9,75	6,6
1,200	1,330	0,013						12
1,200	1,280	0,037						
2,000	2,190	0,050	2,140	0,033	1,65	+0,140	+ 7,0	5,5
2,000	2,120	0,020						9,5
2,000	2,110	0,030						

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 5.

225) Sélectivité.-

Entre les corps susceptibles de fausser les résultats, les suivants entrent pratiquement en ligne de compte : éther, acétone (voir chap. 31) et autres corps cétoniques, aldéhyde formique, méthanol, hydrate de chloral.

En utilisant une seconde méthode de dosage appropriée, par exemple, l'interférométrie (14), on arrive à éliminer ces causes d'erreur. Il convient en plus de s'assurer de la présence d'éthanol par des réactions faciles à effectuer, comme, par exemple, les suivantes :

- 1) Formation de l'ester benzoïque,
- 2) formation de iodoforme (Lieben).

Les deux essais peuvent identifier de l'éthanol jusqu'à une dilution limite d'environ 0,2 o/oo. La seconde réaction met en évidence de l'acétone dans le cas où elle serait positive même à froid. La réaction de Tollens au nitrate d'argent ammoniacal indique des corps réducteurs et celle de Legal au nitroprussiate de sodium, des corps cétoniques.

226) Conclusions.-

Pour la modification que nous avons étudiée, les analyses effectuées sur le sang présentent des erreurs totales entre + 5,5 % et + 22 %. La méthode est trop peu précise et même en introduisant dans le calcul un facteur de correction empirique, elle reste trop peu exacte.

La distillation peut entraîner des erreurs appréciables. Le virage mal défini est une cause d'erreur encore plus grande.

L'oxydation en milieu sulfurique est peu sélective. La présence de matières réductibles dans l'acide sulfurique peut fausser les résultats, la méthode ne prévoyant pas d'essai à blanc.

L'écart type S_Z est très grand comparé aux autres méthodes, soit $6,86 \cdot 10^{-2}$. La valeur de $\bar{Z}$ est de $12,66 \cdot 10^{-2}$, ce qui correspond à une exactitude insuffisante et entraîne une grande marge d'erreur (voir chap. 216 et 4).

Il est certain que d'autres modifications de la méthode Nicloux-directe (par exemple, celle utilisée à Zurich et à Berne) peuvent donner de meilleurs résultats. Mais comme la détection du point final n'est pas modifiée, cette méthode de dosage est trop délicate et doit être contrôlée, pour le moins, par une seconde méthode.

23.- METHODE DE ROCHAT

231) Principe et résumé du mode opératoire.-

En 1931, Nicloux a publié une technique plus exacte que le titrage direct (5).

Cette méthode améliorée comprend une oxydation de l'alcool en tubes fermés par le bichromate de potassium dont on titre l'excès par le sel de Mohr et le permanganate de potassium. Cette méthode est longue et sa technique délicate, aussi n'a-t-elle pas été introduite en Suisse dans la pratique médico-légale.

Rochat (15) reprit l'idée de Nicloux en y apportant un certain nombre de modifications, afin de rendre le procédé plus simple. L'alcool n'est pas oxydé en tubes fermés. Le bichromate est ajouté en léger excès et, pour éviter les pertes provenant entre autres de la formation d'aldéhyde, il ajoute à la solution un volume suffisant d'acide sulfurique concentré. Le dégagement de chaleur qui en résulte augmente la vitesse de réaction. Le titrage est effectué selon la Méthode Nicloux indirecte.

Pour la distillation, Rochat utilise le dispositif Schloesing-Aubin (14) avec réfrigérant en étain (décrit par Nicloux) dont l'extrémité plonge dans quelques centimètres d'eau d'un cylindre gradué de 50 ml. Ce dernier doit pouvoir se fermer hermétiquement. La distillation s'effectue à la pression ordinaire. L'alcool passe avec le premier quart du distillat. Pour plus de sûreté, on distille les $\frac{2}{5}$ du volume initial. Afin d'éviter la formation de mousse, on ajoute au sang 6,5 fois son volume d'acide picrique concentré débarrassé de tout réducteur volatile, par une ébullition préalable.

Rochat utilise les solutions suivantes :

- 1) solution 1/10 normale d'oxalate de sodium ;
- 2) solution de bichromate de potassium : 8,475 g./litre ;
- 3) solution 1/10 normale de permanganate de potassium ;
- 4) solution de sel de Mohr : on dissout 7,8 g. de sel de Mohr dans un litre d'eau distillée additionnée de 20 ml. de H_2SO_4 conc. ;
- 5) acide sulfurique concentré : il est nécessaire de déterminer le pouvoir réducteur éventuel de cet acide avec le permanganate ;
- 6) solution saturée d'acide picrique : on fait bouillir l'acide picrique pendant 20 minutes environ pour évaporer les substances volatiles qu'il pourrait contenir ;
- 7) solution 1/10 normale de thiosulfate de Na ;
- 8) solution d'iodure de K, à environ 10 %.

La détermination du titre des solutions s'effectue de la façon suivante :

1 : solution $KMnO_4$ 0,1 N

Cette solution est titrée préalablement par l'oxalate de sodium. Au besoin, un facteur correctif est introduit dans les calculs.

2 : solution $K_2Cr_2O_7$, 8,475 gr./l.

Cette solution est contrôlée iodométriquement par comparaison avec la solution de $KMnO_4$, elle-même titrée à l'oxalate de sodium.

Détermination du facteur (a - b).

- 1) On titre 5 ml. de la solution de sel de Mohr, additionnée de quelques gouttes de H_2SO_4 concentré, par $KMnO_4$: a ml.
- 2) On titre 5 ml. de la solution de sel de Mohr, additionnée de 0,5 ml. de $K_2Cr_2O_7$ et de quelques gouttes de H_2SO_4 conc., par du permanganate : b ml.

On voit immédiatement que 0,5 ml. de bichromate équivaut oxydimétriquement à (a - b) ml. de permanganate. Réciproquement, 1 ml. de permanganate correspond à $\frac{1}{2(a-b)}$ ml. de bichromate.

Les solutions sont conservées dans des flacons bruns, à l'abri de la lumière. La valeur théorique du facteur ($a-b$) est de 0,864. Ce facteur est constant. Seul le facteur a doit être vérifié avant chaque série de mesures.

Titrage - Principe.

On oxyde l'alcool contenu dans une prise de 5 ml. du distillat par un excès de bichromate. Cet excès est réduit à son tour au moyen de la solution de sel de Mohr, cette solution étant ajoutée elle aussi en excès. Ce dernier excès est titré par la solution de permanganate.

a) Essai d'orientation.

On pipette 5 ml. de distillat dans un becher de 150 ml. On ajoute 6-7 ml. d'acide sulfurique concentré, mesuré dans un cylindre gradué et on mélange rapidement. On laisse couler rapidement la solution de bichromate d'une microburette jusqu'à coloration distinctement jaunâtre. On détermine ainsi grossièrement un volume de bichromate nettement supérieur à celui qui est réellement nécessaire à l'oxydation de l'alcool.

b) Titrage proprement dit.

A 5 ml. de distillat, on ajoute la quantité de bichromate telle qu'elle a été évaluée précédemment. On ajoute d'un coup un volume d'acide sulfurique concentré égal au volume de distillat, plus le volume de bichromate, plus encore 1,5 ml. On agite le mélange en lui imprimant un brusque mouvement de rotation. On attend 25-30 secondes et on dilue au moyen de 50 ml. d'eau.

On ajoute une fois, év. deux fois, 5 ml. de sel de Mohr pour réduire l'excès de bichromate. Le mélange doit devenir bleu-vert. Finalement, on titre en retour l'excès de sel de Mohr par KMnO_4 :

d ml. de permanganate

Calculs.

Dans le cas où l'on a ajouté une fois 5 ml. de sel de Mohr, le volume de bichromate en excès correspond à $a - d$ ml. de permanganate décimormal. Cet excès vaut :

$$\frac{a - d}{2(a - b)} \text{ ml. de bichromate}$$

Le volume de bichromate réellement utilisé pour oxyder l'alcool sera donné par la relation :

$$n = c - \frac{a - d}{2(a-b)}$$

Si l'on a ajouté 2 fois 5 ml. de solution de sel de Mohr :

$$n = c - \frac{2(a - d)}{2(a-b)}$$

Pour évaluer le o/oo en poids d'alcool dans le sang, nous utiliserons la relation suivante :

$$q = \frac{\text{ml. de distillat}}{5}$$

$$\text{o/oo} = \frac{1,98 \cdot n \cdot q \cdot f}{m}$$

$f = 0,97$ pour la solution aqueuse

$f = 0,98$ pour le sang fluoré

$f = 0,99$ pour le sang coagulé

$m =$ poids du sang distillé en grammes

232) Titration.-

Cette étude a été faite par 5 chimistes, de la même façon que le titrage Nicloux direct (voir chap. 222). Pour chacun d'entre eux, les résultats obtenus sont très semblables, aussi ne donnerons-nous ici que ceux obtenus par les chimistes A et B. Pour les calculs, nous avons utilisé le facteur proposé par Ro - chat (voir chap. 31).

Le titrage est facile. Dans l'essai d'orientation, on ajoute du dichromate jusqu'à ce que le liquide soit nettement jaune; on ne s'arrête donc pas au point de virage si délicat du dichromate. Dans l'essai principal, on profite du virage net de la permanganométrie.

Les écarts moyens relatifs à toutes les teneurs en alcool examinées varient de 0,17 % à 0,61 %. Les erreurs moyennes relatives varient de - 1,83 % à + 1,13 % et les er-

reurs extrêmes constatées ont atteint - 2,5 % et + 2,0 % (voir tableaux 6 et 7). La méthode Rochat prévoit un essai à blanc qui élimine les erreurs dues à des impuretés contenues dans l'acide sulfurique.

Cette titration nettement plus longue que celle de la méthode Nicloux-directe est plus précise et plus exacte et moins sensible aux impuretés des réactifs.

233) La distillation.-

Nous avons distillé des solutions aqueuses d'alcool en utilisant l'appareil de Schloesing-Aubin proposé par Rochat et effectué d'une manière très pratique par Wehrli (14) (voir fig. 3). Pour la construction de cet appareil, nous nous sommes basés sur les indications techniques de Wehrli (14). Le réfrigérant est formé par un tube en étain de 2,3 m. de long et d'un diamètre de 10 x 14 mm. Le tube décrit 6 à 7 spires d'un diamètre intérieur d'environ 36 mm. et d'un pas de 5 cm. Le réfrigérant se termine par un tube de verre dont l'extrémité plonge dans un peu d'eau distillée au fond d'un cylindre gradué de 25 ou de 50 ml.

Nous avons distillé les 2/5 du volume soumis, ce qui donnait pour nos essais des volumes de distillat entre 20 et 30 ml.

Le titrage du distillat se fait par la méthode Rochat.

Même en menant la distillation très violemment (à la flamme nue) sans aucune précaution, l'erreur de cette opération et de la titration ne dépasse pas $\pm 5\%$ (voir tableau 8). Dans les cas où nous avons distillé en 15 à 20 minutes sur un treillis métallique, cette erreur ne dépassait pas $\pm 2,5\%$.

234) L'analyse complète sur le sang.-

Les mélanges de sang fluoré et d'alcool ont été préparés selon la méthode décrite dans le chapitre 214.

Le procédé de distillation est analogue à celui indiqué dans le chap. 224.

Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau 9.

TABLEAU 6

Méthode Rochat : titrage de sol. aq. d'alcool.

Analyste A.-

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.rel. %	Erreurs extrêmes %
0,200	0,2002	0,0001	0,2003	0,44	+0,0003	+ 0,15	{ - 0,45
0,200	0,1998	0,0005					
0,200	0,2017	0,0014					
0,200	0,1998	0,0005					
0,200	0,2017	0,0014					{ + 0,8
0,200	0,2009	0,0006					
0,200	0,2009	0,0006					
0,200	0,1991	0,0012					
0,200	0,1991	0,0012					
0,800	0,8067	0,0099	0,7968	0,57	-0,0032	- 0,4	{ - 1
0,800	0,7997	0,0029					
0,800	0,7935	0,0033					
0,800	0,7917	0,0051					{ + 0,9
0,800	0,7917	0,0051					
0,800	0,7975	0,0008					
1,000	0,9827	0,0018	0,9845	0,23	-0,0155	- 1,55	{ - 1,9
1,000	0,9864	0,0019					
1,000	0,9845	0,0000					
1,000	0,9875	0,0030					
1,000	0,9834	0,0011					
1,000	0,9886	0,0041					{ - 1,2
1,000	0,9856	0,0011					
1,000	0,9834	0,0011					
1,000	0,9816	0,0029					
1,000	0,9816	0,0029					
1,200	1,1888	0,0106	1,1782	0,28	-0,0218	- 1,83	{ - 2,5
1,200	1,1877	0,0095					
1,200	1,1833	0,0049					
1,200	1,1716	0,0066					
1,200	1,1756	0,0026					{ - 1,1
1,200	1,1756	0,0026					
1,200	1,1716	0,0066					
1,200	1,1716	0,0066					

TABEAU 7

Méthode Rochat : Titrage de sol. aq. d'alcool.

Analyste B.-

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolus	Résultats moyens	Ecart moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.rel. %	Erreurs extrêmes %
0,500	0,4989	0,0002	0,4991	0,17	-0,0009	- 0,18	(- 0,008
0,500	0,5007	0,0016					
0,500	0,4996	0,0005					
0,500	0,4970	0,0021					
0,500	0,4996	0,0005					
0,500	0,4989	0,0002					(- 0,6
1,000	0,9901	0,0186	1,0087	0,61	+0,0087	+ 0,87	(- 1
1,000	1,0100	0,0013					
1,000	1,0200	0,0113					
1,000	1,0110	0,0023					
1,000	1,0102	0,0015					
1,000	1,0111	0,0024					(+ 2
1,800	1,8036	0,0106	1,8142	0,32	+0,0142	+ 0,79	(+ 0,2
1,800	1,8198	0,0056					
1,800	1,8077	0,0065					
1,800	1,8150	0,0008					
1,800	1,8198	0,0056					
1,800	1,8198	0,0056					(+ 1,1
3,000	3,0140	0,0205	3,0345	0,34	+0,0345	+ 1,13	(+ 0,47
3,000	3,0402	0,0057					
3,000	3,0389	0,0044					
3,000	3,0451	0,0106					(+ 1,5

TABLEAU 8

Méthode Rochat : Distillation et titrage de sol. aq. d'alcool.

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecarts absolus	Résultats moyens	Ecarts moyens relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.rel. %	Erreurs extrêmes %
0,500	0,5006	0,0082	0,4924	1,66 %	-0,076	- 1,52%	+ 0,12
0,500	0,4843	0,0081					- 3
0,500	0,5006	0,0082					
0,500	0,4843	0,0081					
0,200	0,2050	0,0023	0,2073	0,86 %	+0,073	+ 3,55%	+ 2,5
0,200	0,2070	0,0003					+ 5
0,200	0,2100	0,0027					
0,800	0,7840	0,0151	0,7991	0,95 %	-0,0009	- 0,11%	+ 0,06
0,800	0,8005	0,0014					
0,800	0,8005	0,0014					
0,800	0,8115	0,0124					- 2
1,000	1,0063	0,0057	1,0120	0,75 %	+0,0120	+ 1,2 %	+ 0,6
1,000	1,0233	0,0113					+ 2,3
1,000	1,0063	0,0057					
2,000	1,955	0,0050	1,950	0,43 %	- 0,05	- 2,5 %	- 2,3
2,000	1,955	0,0050					- 3
2,000	1,940	0,0100					
3,000	2,980	0,002	2,978	0,44 %	- 0,022	- 0,73%	+ 0,3
3,000	2,980	0,002					
3,000	2,950	0,028					
3,000	2,965	0,013					
3,000	2,980	0,002					
3,000	3,010	0,032					- 1,7

TABLEAU 9

Méthode Rochat : analyse complète de sang alcoolisé in vitro.

Valeurs réelles en ‰	Valeurs trouvées en ‰	Ecart absolu	Résultats moyens	Ecart moyen relat.	Erreurs m. abs.	Erreurs m. relat. %	Erreurs extrêmes %
0,500	0,496	0,009	0,487	1,03	- 0,013	- 2,60	(- 0,8
0,500	0,483	0,004					
0,500	0,488	0,001					
0,500	0,483	0,004					) - 3,4
0,800	0,776	0,014	0,790	1,01	- 0,010	- 1,25	(+ 0,6
0,800	0,784	0,006					
0,800	0,805	0,015					
0,800	0,784	0,006					
0,800	0,784	0,006					
0,800	0,790	0,000					
0,800	0,790	0,000					
0,800	0,805	0,015					) - 3,0
1,000	0,984	0,008	0,976	0,61	- 0,024	- 2,40	(- 1,6
1,000	0,984	0,008					
1,000	0,967	0,009					
1,000	0,974	0,002					
1,000	0,974	0,002					) - 3,3
2,000	1,925	0,005	1,930	0,26	- 0,070	- 3,50	(- 3,2
2,000	1,925	0,005					
2,000	1,935	0,005					
2,000	1,935	0,005					) - 3,8
3,000	2,842	0,087	2,929	0,29	- 0,071	- 2,37	(+ 3,3
3,000	2,870	0,059					
3,000	2,903	0,026					
3,000	3,100	0,171					) - 5,3

235) Sélectivité.-

Rochat affirme qu'il est possible de doser l'alcool en présence d'acétone. Cette dernière substance ne gêne pas même si sa concentration est le double de celle de l'alcool. Pourtant, il faut reconnaître que dans ces conditions, l'analyse est délicate, car les vitesses d'oxydation de l'alcool et de l'acétone ne présentent pas de grande différence. Le temps d'oxydation ne doit pas dépasser 15 secondes (au lieu de 25 à 30 secondes dans la technique habituelle). De plus, l'excès de bichromate doit être au maximum de 0,03 ml. La première de ces conditions est facilement réalisable, mais la seconde présente certaines difficultés. Pour des teneurs d'acétone égales à celles d'alcool, nous avons eu des erreurs comprises entre 10 et 20 % (pour 3 chimistes).

Pour les essais qualitatifs recommandés, voir chap. 225.

236) Conclusions.-

La méthode Rochat est suffisamment précise et exacte. Les erreurs commises sur un très grand nombre d'analyses complètes effectuées par 5 analystes sont comprises entre - 3,8 et + 0,6 % pour des échantillons contenant 0,50 à 2,0 o/oo d'alcool. A 3 o/oo, l'erreur max. constatée est de - 5,3 %.

Dans cette méthode, le virage est net, elle tient compte de l'instabilité des réactifs et des impuretés qui peuvent s'y trouver.

Par des manipulations délicates, il est possible de doser l'alcool en présence d'une quantité égale d'acétone.

L'écart type S_Z est petit, soit $1,27 \cdot 10^{-2}$. La valeur de $\bar{Z}$ est de $-2,19 \cdot 10^{-2}$ et indique une plus grande exactitude que pour la méthode précédente.

Pour la limite de confiance et l'étude comparative des méthodes, voir chap. 4.

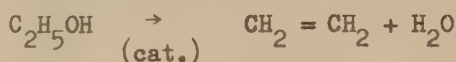
24.- METHODE DE SCHIFFERLI

241) Principe (16).-

Cette méthode est basée sur la décomposition pyrogénée de l'éthanol en éthylène en présence d'un catalyseur. L'éthylène est entraîné dans une solution de brome, dont on détermine l'excès non employé pour la formation du bromure d'éthyle.

Les réactions :

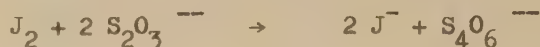
a) Formation d'éthylène



b) Bromuration



c) Titrage de l'excès de brome



Le catalyseur est constitué par des grains de pierre ponce de 1 à 2 mm. de diamètre, imbibés d'acide pyrophosphorique. Il est préparé comme suit : Les grains de pierre ponce sont traités à l'acide chlorhydrique, puis à l'acide sulfurique et lavés jusqu'à réaction neutre et calcinés au blanc. Après refroidissement, ces grains sont imbibés d'acide orthophosphorique, puis chauffés plusieurs heures entre 250 et 280° (transformation de l'acide ortho- en acide pyrophosphorique). Le catalyseur peut être utilisé pour un grand nombre d'analyses (au moins 30).

242) Appareillage et dosage.—

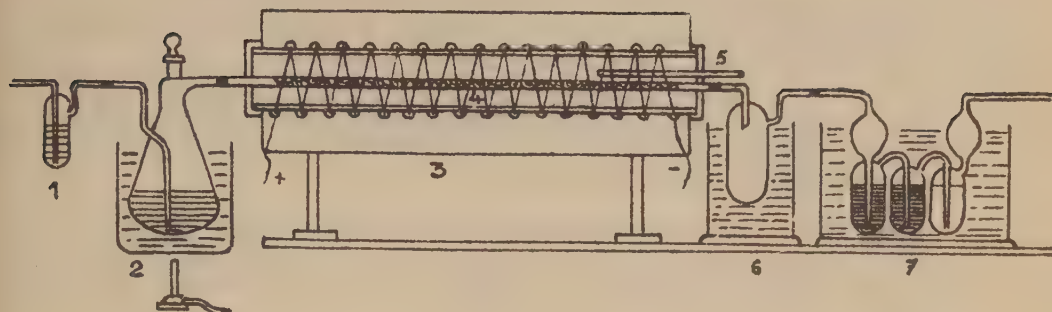


Fig. 1

Appareil pour le dosage de l'éthanol selon Schifferli.

Le liquide à analyser est introduit dans une sorte de cornue de 150 ml. de volume environ (2) plongeant dans un bain-marie chauffé à 105°C . La cornue est reliée à un tube de pyrex (65 cm. de long., 10 mm. de diamètre intérieur) chauffé au moyen d'un four électrique entre 280 et 300° , renfermant le catalyseur. Un courant d'azote purifié dans un flacon laveur (1) renfermant une solution d'hydrosulfite de soude (pour absorber les traces d'oxygène), puis dans un flacon à acide sulfurique concentré (ne figurant pas dans le dessin), barbotte ensuite dans le liquide à analyser et entraîne les vapeurs d'alcool. Celles-ci traversent le four, passent dans un tube (6) refroidi par un bain d'eau, puis dans 2 barboteurs renfermant une solution titrée de brome dans le tétrachlorure de carbone (solution 0,1 normal) enfin, dans un troisième récipient contenant du tétrachlorure de carbone pur et qui sert de contrôle (perte en brome).

L'excès de brome est titré par une solution 0,1 normal de thiosulfate de sodium. Cette opération s'effectue dans un petit ballon à col étroit grâce auquel il est aisé d'assurer par agitation un contact étroit entre les 2 phases, après chaque

addition de thiosulfate. Le titrage ne présente aucune difficulté puisque, au virage, la solution passe du violacé à l'incolore. La présence d'amidon n'est pas nécessaire.

Pour les calculs, nous nous sommes servis d'une table remise par l'auteur qui est basée sur l'équivalence : 1 ml. de la solution de brome 0,1 n correspond à 0,0023024 g. d'éthanol.

Avant chaque série d'analyses, on contrôle la solution de brome. On ajoute d'abord une quantité de KJ qui doit être le double du brome et on titre l'excès de ce dernier par une solution de thiosulfate 0,1 n.

L'azote comprimé de qualité habituelle est d'une pureté qui varie entre 99 % et 99,5 %. Nous conseillons pour ces dosages l'azote purifié (par exemple, Carba) qui contient 99,9 % à 99,95 % d'azote.

243) Dosages de solutions aqueuses d'éthanol.-

Comme pour les méthodes précédentes, nous avons utilisé des solutions aqueuses d'éthanol, dont nous décrivons la préparation dans le chap. 213. Trois analystes ont pris part à ces essais. Nous avons éliminé une dizaine de résultats présentant des erreurs pouvant aller jusqu'à ± 20 %, erreurs dues entre autres au fait que le courant d'azote n'a pas été réglé selon les prescriptions de l'auteur, qu'il renfermait probablement des traces d'oxygène et que la température n'a pas été suffisamment contrôlée.

Pour les teneurs d'alcool de 0,5 o/oo et de 1,5 o/oo, nous avons ajouté des quantités d'acétone doubles de la concentration en alcool.

Les écarts moyens relatifs pour les analyses complètes sur des solutions aqueuses d'éthanol varient de 0,91 % à 2,83 %. Les erreurs moyennes relatives varient de - 4,28 % à - 1,25 % et les erreurs extrêmes constatées ont atteint - 6,25 % et + 2,0 % (voir tableau 10).

TABLEAU 10

Méthode Schifferli : Analyses de solutions aqueuses d'alcool.

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolu	Résultats moyens	Ecart moyen abs.	Ecart moyen relat.	Erreurs m.abs.	Erreurs m.relat. %	Erreurs extrêmes %	Analyste
1) 0,50	0,48	0,007	0,487	0,0122	2,50	-0,013	- 2,6	+ 2	A
0,50	0,49	0,003							
0,50	0,51	0,023							
0,50	0,47	0,017						- 6	
0,80	0,79	0,000	0,790	0,0167	2,17	-0,010	- 1,25	0	B
0,80	0,80	0,010							
0,80	0,82	0,030							
0,80	0,78	0,010							
0,80	0,80	0,010							
0,80	0,75	0,040						- 6,25	
1,00	0,97	0,008	0,978	0,0277	2,83	-0,022	- 2,2	+ 2	B
1,00	0,96	0,016							
1,00	1,02	0,042							
1,00	0,95	0,028							
1,00	1,02	0,042							
1,00	0,95	0,028						- 5	
1,20	1,15	0,023	1,173	0,0223	1,90	-0,027	- 2,25	0	C
1,20	1,18	0,007							
1,20	1,13	0,043							
1,20	1,20	0,027							
1,20	1,19	0,017							
1,20	1,19	0,017						- 4,16	
1,50	1,45	0,018	1,468	0,0264	1,80	-0,032	- 2,12	+ 0,67	B
1,50	1,42	0,048							
1,50	1,48	0,012							
1,50	1,51	0,042							
1,50	1,48	0,012						- 3,3	
1,80	1,73	0,007	1,723	0,0157	0,91	-0,077	- 4,28	- 3,32	A
1,80	1,70	0,023							
1,80	1,74	0,017						- 5,55	
2,00	1,91	0,014	1,924	0,0288	1,50	-0,076	- 3,8	- 1,5	A
2,00	1,88	0,044							
2,00	1,95	0,026							
2,00	1,91	0,014							
2,00	1,97	0,046						- 6	

1) en présence de quantité double d'acétone.

244) Analyses sur le sang.-

Les mélanges de sang fluoré et d'éthanol ont été préparés selon la méthode décrite dans le chap. 214.

Dès que l'échantillon de sang est introduit dans la cornue (fig. 1, No 2), on ajoute - selon l'auteur de la méthode - environ 3 volumes d'une solution sat. d'acide picrique.

Il nous semble que pour empêcher la formation de mousse, il serait plus favorable d'ajouter au sang fluoré environ 5 volumes de la solution d'acide picrique.

Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau 11.

245) Sélectivité.-

Nous avons effectué les dosages d'alcool selon la méthode Schifferli en présence de quantités d'acétone allant jusqu'au double de celles de l'alcool. Voir tableau 10, valeurs 0,5 et 1,5 et tableau 11, valeur 1,00. L'acétone ne gêne pas le dosage.

La transformation pyrogénée catalytique de l'alcool en éthylène et la bromuration rendent cette analyse très sélective pour l'alcool éthylique.

TABLEAU 11

Méthode Schifferli : Analyse de sang alcoolisé in vitro.

Valeurs réelles en o/oo	Valeurs trouvées en o/oo	Ecart absolu	Résultats moyens	Ecart moyen abs.	Ecart moyen relat.	Erreurs m. abs.	Erreurs m. rel. %	Erreurs extrêmes %
0,50	0,47	0,010	0,480	0,0066	1,32	- 0,020	- 4	- 2
0,50	0,49	0,010						- 6
0,50	0,48	0,000						- 3
1,00	0,97	0,007	0,963	0,0090	0,90	- 0,037	-3,7	- 5
1,00	0,97	0,007						- 2
1,00	0,95	0,013						- 4
1,00	0,96	0,010	0,970	0,0066	0,68	- 0,030	- 3	- 1,3
1,00	0,97	0,000						- 5,3
1,00	0,98	0,010						- 3
1,50	1,42	0,030	1,450	0,020	1,33	- 0,050	-3,3	- 4
1,50	1,45	0,000						- 3
1,50	1,48	0,030						- 3

1) en présence d'une quantité égale d'acétone.

244

246) Conclusions.-

Les erreurs commises sur les analyses de sang sont comprises entre - 6 % et - 1,3 %. La titration prévue par la méthode présente un virage net (passage du violet à l'incolore). La méthode tient compte de l'instabilité des réactifs.

La méthode est très sélective et l'acétone ne gêne pas.

L'analyse utilise de trop grandes quantités de sang. Pour un seul essai, il faut env. 10 ml. Les méthodes précédentes fournissent avec 5 à 10 ml. de sang une quantité de distillat suffisante pour 2 dosages selon 2 méthodes différen-

Pour obtenir des résultats convenables, il est nécessaire d'observer les prescriptions suivantes : appareillage soigneusement mis au point, température du four comprise entre 280 et 300°, courant d'azote minutieusement réglé et maintenu constant et bombe d'azote pur (exempt d'oxygène).

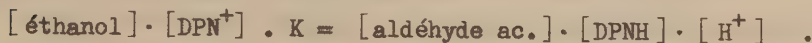
Pour la comparaison statistique des méthodes, voir chap. 4. L'écart type SZ est $1,45 \cdot 10^{-2}$; la valeur de $\bar{Z}$ est de $-3,42 \cdot 10^{-2}$. La méthode est donc beaucoup plus exacte et précise que la modification étudiée de Nicloux, mais moins que la méthode Rochat.

251) Principe et résumé du mode opératoire.-

L'analyse est basée sur la réaction :



En fixant l'aldéhyde acétique (par le semi-carbazide) et en travaillant en milieu alcalin, l'équilibre est déplacé à droite, selon l'équation



Pratiquement, tout l'éthanol est transformé en aldéhyde et le DPNH formé est déterminé au spectrophotomètre. Nous avons utilisé pour ces mesures un spectrophotomètre Eppendorf (Maison Netheler et Hinz, Hamburg) et un filtre Hg. 366 nm. Le fait que le coefficient molaire d'extinction est diminué de 43,5 % à cette longueur d'onde, ne gêne pas le dosage médico-légal.

Le DPN et l'ADH a été mis à notre disposition par la maison Boehringer et fils, Mannheim. Cette maison a publié une brochure contenant un mode opératoire que nous avons rigoureusement suivi pour nos expériences (pour les détails, voir les publications mentionnées) :

Déprotéinisation de 0,5 ml. de sang ou de sérum avec 4 ml. d'acide perchlorique 3,4 % vol. Centrifugation (5 min. à env. 3000 tours / min.). Dans un tube de 5 ml. (à bouchon rodé), on introduit : 4,8 ml. de la solution tampon pH env. 8,7, 0,1 ml. de la solution DPN (Boehringer), mélanger et ajouter 0,10 ml. de la prise déprotéinisée et enfin, 0,02 ml. de la suspension ADH (Boehringer). Mélanger et laisser reposer pendant 70 minutes (à une température entre 21 à 26°). Mesurer l'extinction à 366 nm. en comparant à un essai à blanc qui contient à la place du sang ou du sérum, 0,1 ml. d'acide perchlorique.

Cuves en verre, diamètre 1 cm.

Pour des raisons indiquées dans le chap. 213, nous avons préparé nos solutions d'éthanol pour faire les courbes d'étalonnage, avec de l'alcool absolu et non pas selon la méthode par hydrolyse proposée par la maison Boehringer.

La solution tampon (pH env. 8,7) est préparée comme suit :

10 g. pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)

2,5 g. semicarbazide HCl

0,5 g. glycocolle

dans 250 ml. d'eau bidist. ajouter 10 ml. NaOH 2 n

Compléter à 300 ml. avec de l'eau bidistillée.

Nous avons utilisé des pipettes spéciales en emploi dans les instituts allemands de 0,1 et 0,2 ml. à pointe étirée, fournies par la maison.

252) Dosages de solutions aqueuses d'éthanol.-

Pour la préparation des solutions d'éthanol, voir chap. 213.

Pour nous faire la main, nous avons d'abord effectué plusieurs courbes d'étalonnages, dont nous ne retenons que la dernière. Nous l'avons complétée avec les essais publiés dans le tableau 12. Les valeurs moyennes nous servent de base pour les calculs suivants (tableaux 13 et 14).

Les écarts moyens relatifs varient de 0,15 % à 2,27 %. Les erreurs moyennes relatives varient de - 3,20 % à + 3,67 % et les erreurs extrêmes constatées ont atteint - 4,9 % et + 5,0 %.

253) Analyses sur le sérum.-

Le service des dosages d'alcool de la police ayant été installé dans nos laboratoires, nous avons utilisé pour les essais suivants du sang alcoolisé in vivo (prises de sang de la police). Au début, ces prises ont été effectuées au moyen de veinotubes non fluorés. Les essais du tableau 13 ont été effectués sur de tels échantillons. Par la suite, la police a utilisé les veinotubes de 10 ml. contenant 0,10 gr. de NaF (voir chap. 214) ce qui nous a facilité les essais sur le sang total.

Pour les essais des chap. 253 et 254, nous avons effectué dans chaque cas les analyses par 3 méthodes :

- a) méthode Rochat (voir chap. 23)
- b) méthode polarographique (voir chap. 32)
- c) méthode ADH.

Les deux premières méthodes nous sont connues comme très précises et exactes. Les valeurs moyennes fournies par elles nous ont servi de valeurs réelles avec lesquelles nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode ADH. Nous admettons que dans les différences constatées sont incluses les erreurs inhérentes à la moyenne des 2 premières méthodes, mais

nous estimons qu'elles ne dépassent guère les erreurs de la préparation d'échantillons de sang alcoolisé in vitro. Ainsi, ces résultats peuvent être comparés aux tableaux précédents.

Les résultats obtenus sur les échantillons de sérum se trouvent dans le tableau 13 ; pour le calcul d'erreur, voir chap. 256.

Les résultats obtenus pour les échantillons de sérum sont divisés par le facteur de répartition 1,2 et par le poids spécifique moyen du sérum, soit 1,03. Ainsi, on obtient la concentration de l'alcool dans le sang en o/oo poids.

254) Analyses sur le sang.—

Pour ces essais, nous avons utilisé des échantillons de sang fluorés alcoolisés in vivo (prises de sang de la police). L'addition de NaF au sang dans la proportion 0,01 g./ml. ne gêne pas le dosage (21). Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau 14 ; pour la comparaison, voir chap. 256.

255) Sélectivité (21, 19).—

L'alcool méthylique n'est pas oxydé. Par contre, les alcools primaires possédant 2 à 4 atomes de carbone en chaîne droite, le sont ; et cela, d'autant plus que leur chaîne est courte.

Suivant la quantité de ferment employé, l'alcool isopropylique et des alcools secondaires peuvent éventuellement fausser le résultat. L'alcool allylique réagit avec l'enzyme, aussi bien que l'éthanol. Il semble que la sélectivité de l'enzyme ADH du foie est à peu près égale à celle de l'ADH de la levure. Avec le premier (employé dans la méthode suédoise), réagissent, en outre, la vitamine A et la glycérine. Dans le sang de personnes à jeun d'alcool, on ne trouve pas de valeur appréciable de substances réagissant comme l'éthanol.

Ether, chloroforme, acétone et acide acétylacétique ne gênent pas le dosage (ce que nous avons vérifié).

256) Conclusions.—

A plusieurs reprises, nous avons eu des séries d'analyses à résultats aberrants. Nous en avons rendu responsable l'atmosphère infectée par toutes sortes de vapeurs de notre

institut. Effectivement, pendant des périodes où nous avons travaillé les fenêtres ouvertes, nous n'avons jamais eu de difficultés.

Les erreurs commises sur les analyses de sang sont comprises entre $-6,85\%$ et $+5,87\%$ et celles des analyses du sérum entre $-6,99\%$ et $+5,16\%$. Pour le sérum, la valeur de S_Z (voir chap. 216) est $4,32 \cdot 10^{-2}$ et celle de $\bar{Z}$ est de $-0,13 \cdot 10^{-2}$. La méthode est très exacte, mais un peu moins précise que les méthodes Rochat et Schifferli.

Vu la bonne sélectivité, cette méthode constitue un moyen précieux de contrôle, cela d'autant plus qu'elle se prête facilement à des dosages en grande série et qu'elle ne demande que de très petites quantités de sang ou de sérum.

Les réactifs fournis par la maison Boehringer (1 unité = 50 dosages) doivent être employés dans le délai indiqué sur l'emballage, ce qui limite quelque peu l'emploi de cette méthode dans des laboratoires ayant peu de dosages d'éthanol à effectuer (moins de 25 par mois).

TABLEAU 12

Méthode ADH (par fermentation).

Analyse de solutions aqueuses d'alcool.

Valeurs réelles en ‰	Valeurs trouvées en ‰	Ecart absolu	Résultat moyen	Ecart moyen abs.	Ecart moyen relat.	Erreur m. abs.	Erreur m. relat.	Erreur extrême %
0,200	0,210	0,004	0,206	0,0043	2,09	+ 0,006	+ 3,00	+ 0,5
0,200	0,208	0,002						+ 5,0
0,200	0,199	0,007						
0,500	0,478	0,006	0,484	0,0060	1,24	- 0,016	- 3,20	- 4,4
0,500	0,493	0,009						- 1,4
0,500	0,481	0,003						
1,000	1,046	0,025	1,021	0,0232	2,27	+ 0,021	+ 2,10	- 1,1
1,000	0,989	0,032						
1,000	1,026	0,005						
1,000	1,094	0,028	1,173	0,0244	2,08	- 0,027	- 2,25	+ 4,9
1,000	0,995	0,026						- 4,9
1,200	1,163	0,005						
1,200	1,203	0,030	1,173	0,0244	2,08	- 0,027	- 2,25	+ 0,4
1,200	1,141	0,032						
1,200	1,150	0,023						
1,200	1,205	0,032	1,866	0,0027	0,15	+ 0,066	+ 3,67	+ 3,4
1,800	1,862	0,004						+ 3,8
1,800	1,869	0,003						
1,800	1,867	0,001	2,064	0,0140	0,68	+ 0,064	+ 3,20	+ 2,2
2,000	2,080	0,016						+ 4,0
2,000	2,043	0,021						
2,000	2,069	0,005						

TABLEAU 13

Méthode ADH (par fermentation).

Analyse de sérum alcoolisé in vivo.

Moyenne des résultats obtenus par la méthode Rochat et macro- polarographie	Résultats obtenus par la méthode ADH	Diff. abs.	Diff. relat. %
0,437	0,452	+ 0,015	+ 3,43
0,581	0,569	- 0,012	- 2,07
0,678	0,713	+ 0,035	+ 5,16
0,890	0,905	+ 0,015	+ 1,69
1,024	0,985	- 0,039	- 3,81
1,146	1,093	- 0,053	- 4,63
1,589	1,478	- 0,111	- 6,99
1,670	1,732	+ 0,062	+ 3,72
1,925	1,969	+ 0,044	+ 2,29
2,133	2,028	- 0,105	- 4,92
2,407	2,530	+ 0,123	+ 5,11
2,911	2,793	- 0,118	- 4,05

TABLEAU 14

Méthode ADH (par fermentation).

Analyse de sang alcoolisé in vivo.

Moyenne de résultats obtenus par la méthode Rochat et macro- polarographie	Résultats obtenus par la méthode ADH	Diff. abs.	Diff. relat. %
0,381	0,365	- 0,016	- 4,20
0,513	0,487	- 0,026	- 5,07
0,788	0,734	- 0,054	- 6,85
0,829	0,872	+ 0,043	+ 5,19
0,996	1,015	+ 0,019	+ 1,91
1,021	0,971	- 0,050	- 4,89
1,103	1,164	+ 0,061	+ 5,53
1,457	1,513	+ 0,056	+ 3,85
1,805	1,696	- 0,109	- 6,04
2,233	2,364	+ 0,131	+ 5,87
2,586	2,520	- 0,066	- 2,55
2,882	3,019	+ 0,137	+ 4,75

26.- DRUNKOMETER : ANALYSE D'ALCOOL SUR L'AIR D'EXPIRATION

261) Principe.-

Nous avons fait quelques essais de dosage de l'alcool avec l'éthylomètre (Drunkometer Harger) mis à notre disposition par la Fédération antialcoolique de Genève.

Des études effectuées en Amérique ont démontré qu'un quart d'heure après ingestion d'alcool, il y a proportionnalité entre la teneur de l'alcool du sang et celle de l'air expiré.

L'appareil comporte un ballon de caoutchouc dans lequel le sujet souffle. Cet air expiré est envoyé dans un barboteur renfermant une solution titrée de permanganate et de l'acide sulfurique concentré jusqu'à décoloration (violet à jaunâtre). Un tube témoin permet d'apprécier de façon précise la fin de la réaction. Le volume d'air expiré nécessaire à cette décoloration est mesuré au moyen d'un cylindre gradué par déplacement de l'eau. La graduation de ce volume est directement exprimée en o/oo d'alcool.

262) Dosages (31).-

Les essais ont été effectués de la manière suivante : une heure et demie après ingestion de quantité connue d'alcool, nous avons analysé l'air expiré et, dans le même temps, nous avons effectué le dosage d'alcool dans le sang, selon la méthode Rochat.

Les résultats sont donnés dans le tableau 15.

Toutes les opérations ont été effectuées au laboratoire, c'est-à-dire à une température à peu près constante. De plus, les phénomènes d'adsorption, de condensation de l'alcool dans le ballon et dans le tube d'admission ont été rendus aussi faibles et reproductibles que possible par des manipulations rapides et chronométrées.

263) Conclusions.-

L'erreur moyenne relative est de + 11,37 % et les erreurs extrêmes ont atteint - 22,6 % et + 50 %. La valeur de S_Z (voir chap. 216) est de 21,44 . 10^{-2} et celle de Z égale à + 10,88 . 10^{-2} . La méthode n'est donc ni précise ni exacte. Elle est inutilisable surtout quand on sait qu'elle est destinée à être

employée par les agents de la circulation.

Nous avons constaté, de plus, que si l'on fait varier le temps entre le remplissage du ballon et le passage de l'air dans l'appareil, on obtient de grandes variations dans les résultats. Cette méthode convient donc éventuellement pour une détermination semi-quantitative, nous ne pensons pas qu'elle puisse remplacer les méthodes actuellement en usage dans le domaine médico-légal.

TABLEAU 15

Drunkometer : Analyse sur l'air d'expiration.

Résultat moyen obtenu par mé- thode Rochat o/oo	Résultat moyen obtenu par éthylomètre o/oo	Différence absolue	Différence relative en %
1,42	1,8	+ 0,38	+ 26,8
1,80	1,5	- 0,30	- 16,7
2,10	2,2	+ 0,10	+ 4,8
2,51	2,1	- 0,41	- 16,6
1,52	1,8	+ 0,28	+ 18,4
1,23	1,0	- 0,23	- 18,7
1,01	1,0	- 0,01	- 1
1,25	1,5	+ 0,25	+ 20
0,92	1,2	+ 0,28	+ 30,4
1,38	1,5	+ 0,12	+ 8,7
1,48	1,6	+ 0,12	+ 8,1
1,55	1,2	- 0,35	- 22,6
1,20	1,4	+ 0,20	+ 16,7
1,75	1,9	+ 0,15	+ 8,6
1,05	1,3	+ 0,25	+ 23,8
0,80	1,2	+ 0,40	+ 50,0
0,92	1,3	+ 0,38	+ 41,5
1,50	1,3	- 0,20	- 13,3
0,90	1,1	+ 0,20	+ 22,1
0,95	1,2	+ 0,25	+ 26,2

27.- BREATHALYZER (ANALYSE D'ALCOOL SUR L'AIR D'EXPIRATION)

271) Principe.-

Par une statistique faite sur les résultats d'env. 300 prises de sang pour la police, nous avons cherché la fréquence des différents teneurs en alcool. Il sortait de ce travail que la police ne demandait presque jamais la prise de sang pour des sujets ayant une alcoolémie en-dessous de 1,5 o/oo. Des renseignements pris auprès des gendarmes, nous avons constaté qu'ils hésitaient à demander la prise de sang dans les cas où l'influence de l'alcool ne se manifestait pas. Or, de nombreux travaux ont suffisamment prouvé que l'influence de l'éthanol même en-dessous de 1,5 o/oo peut être considérable.

Pour faire face à cette difficulté, notre laboratoire a obtenu à l'examen un appareil perfectionné qui dose l'alcool sur l'air d'expiration. Cet appareil, appelé Breathalyzer, nous a été prêté par la police d'Indianapolis.

La méthode est basée sur le fait que pour des températures comprises entre 31 et 34°, 2100 ml. d'air d'expiration contiennent la même quantité d'alcool que 1 ml. de sang.

Tout l'appareil (voir fig. 2) est chauffé à 45-50°C. Quand le sujet souffle, un petit cylindre incorporé à l'appareil prélève 52,5 ml. d'air d'expiration. Cet air est envoyé ensuite dans une ampoule contenant 3 ml. d'une solution de dichromate de potassium à 0,025 % dans un mélange de volumes égaux acide sulfurique et eau. Cette ampoule étant chauffée à 65°C., la réduction du dichromate en quantité équivalente à l'alcool se fait en une minute. Comme cette ampoule est placée dans un colorimètre à 2 cellules photoélectriques, on peut mesurer la diminution de la coloration jaune par rapport à une ampoule témoin fermée. Le schéma de l'appareil se voit dans la fig. 2. Pour compenser la différence d'absorption, on déplace la source lumineuse vers le tube qui absorbe davantage. Ce mouvement entraîne une aiguille indiquant sur un cadran les o/oo d'alcool dans le sang.

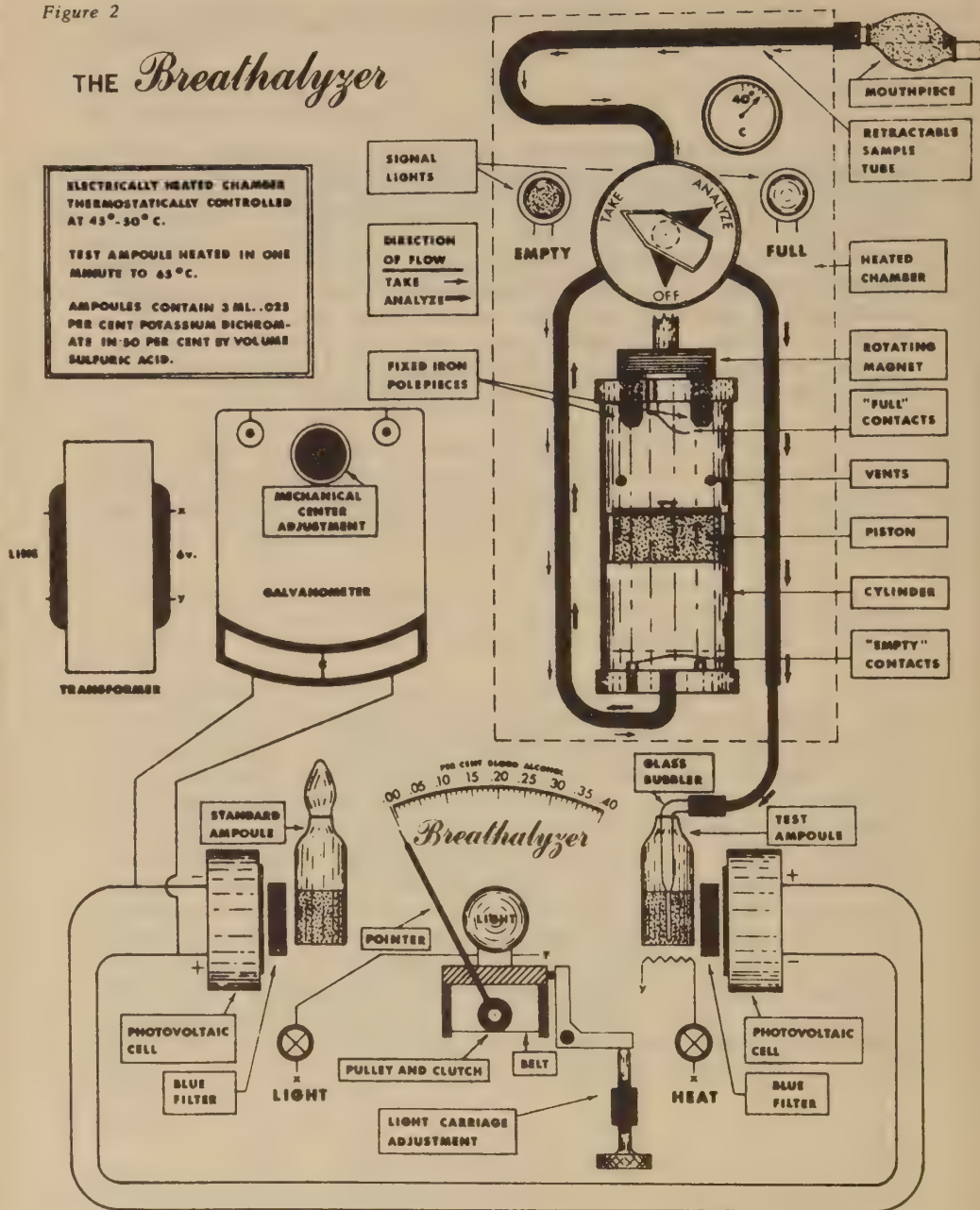
Figure 2

THE *Breathalyzer*

ELECTRICALLY HEATED CHAMBER
THERMOSTATICALLY CONTROLLED
AT 45°-50° C.

TEST AMPOULE HEATED IN ONE
MINUTE TO 65° C.

AMPOULES CONTAIN 3 ML. 0.25
PER CENT POTASSIUM DICHROM-
ATE IN 50 PER CENT BY VOLUME
SULPHURIC ACID.



272) Dosages.-

Dans nos laboratoires, nous avons fait ingérer par des personnes des quantités d'alcool connues (sous forme de vin et de Whisky). Au bout de 90 minutes, nous avons procédé à une prise de sang dans la veine ou au bout du doigt (sang capillaire) et à l'analyse sur l'air d'expiration.

Les analyses de sang ont été effectuées par la méthode polarographique (voir chap. 32) pour le sang veineux, et par micro-spectrophotométrie (voir chap. 34), pour le sang capillaire.

Les résultats obtenus se trouvent dans les tableaux 16 et 17.

TABEAU 16.-

Breathalyzer : Analyse sur l'air d'expiration.

Résultats obtenus par macro-polarographie	Résultats obtenus par le Breathalyzer	Diff. abs.	Diff. relat. %
0,507	0,52	+ 0,013	+ 2,56
0,536	0,57	+ 0,034	+ 6,34
0,564	0,51	- 0,054	- 9,58
0,835	0,88	+ 0,045	+ 5,39
0,852	0,82	- 0,032	- 3,76
0,915	0,87	- 0,045	- 4,92
1,066	0,99	- 0,076	- 7,13
1,354	1,43	+ 0,076	+ 5,61
1,415	1,32	- 0,095	- 6,71
1,526	1,65	+ 0,124	+ 8,12

TABLEAU 17

Breathalyzer : Analyse sur l'air d'expiration.

Résultats obtenus par micro-spectrophotometrie	Résultats obtenus par le Breathalyzer	Diff. abs.	Diff. relat. %
0,515	0,54	+ 0,025	+ 4,85
0,616	0,60	- 0,016	- 2,60
0,640	0,60	- 0,040	- 6,25
0,698	0,76	+ 0,062	+ 8,89
0,717	0,76	+ 0,043	+ 6,00
0,748	0,78	+ 0,032	+ 4,27
0,822	0,88	+ 0,058	+ 7,05
0,897	0,81	- 0,087	- 9,70
0,903	0,83	- 0,073	- 8,09
0,957	0,99	+ 0,033	+ 3,45
0,995	0,93	- 0,065	- 6,53
1,054	0,97	- 0,084	- 7,96
1,347	1,27	- 0,077	- 5,72
1,593	1,48	+ 0,087	+ 6,24
1,510	1,57	+ 0,060	+ 3,98

273) Conclusions.-

Elles sont basées sur le tableau 17. En admettant que la valeur trouvée par l'analyse de sang est exacte, nous trouvons une erreur moyenne relative de $-0,14\%$ et des erreurs extrêmes de $-9,70\%$ et $+8,89\%$. La valeur de S_Z (voir chap. 216) est de $6,65 \cdot 10^{-2}$ et celle de $\bar{Z}$ égale à $-0,13 \cdot 10^{-2}$. La méthode est donc très exacte et vu sa simplicité, relativement précise (voir chap. 4).

Nous l'avons retenue comme analyse donnant un préavis. Lorsque le résultat est de 10/100 ou plus, le sujet est prié de se soumettre à une prise de sang.

Les manipulations ne comportent aucun transvasage et aucun pipetage, le réactif étant fourni dans des ampoules fermées. Les sous-officiers de la brigade de circulation ont appris avec facilité le maniement de cet appareil. Depuis son introduction, la fréquence des analyses a fortement augmenté.

28.- CONCLUSIONS DE L'ETUDE CRITIQUE

L'emploi de la méthode Nicloux-directe dans la modification que nous venons d'étudier est à déconseiller; elle peut donner lieu à de graves erreurs. Il en est de même pour l'appareil "Drunkometer" qui dose l'alcool dans l'air d'expiration. La méthode très sélective de Schifferli se prête mal aux dosages en série et utilise trop de sang, ce qui rend impossible un contrôle par une autre méthode.

Nous retenons pour sa plus grande sélectivité la méthode ADH et pour sa précision la méthode Rochat.

Pour le dosage de l'alcool sur l'haleine, nous recommandons le Breathalyzer à condition que son résultat soit considéré comme préavis.

Le dosage indirect de l'éthanol par le dichromate selon Rochat peut être considéré comme une des méthodes les plus précises et exactes. Malheureusement, elle demande plusieurs solutions titrées.

Par une série de recherches, nous tâcherons de rendre l'oxydation par le dichromate plus sélective et d'utiliser des procédés physico-chimiques pour rendre le dosage plus rapide et plus sûr et pour éliminer les solutions titrées.

3.- RECHERCHES POUR AMELIORER LE DOSAGE DE L'ETHANOL

31.- L'OXYDATION DE L'ETHANOL PAR LE DICHROMATE.

Dans les méthodes utilisant le dichromate comme oxydant que nous venons d'examiner, on travaille en milieu acide sulfurique. Dans les conditions où l'on travaille, la réaction n'est pas tout à fait stoechiométrique et l'acétone est oxydé, en partie du moins.

Nous basant sur la méthode indirecte de Rochat, nous avons fait varier la concentration en acide sulfurique. Par ce moyen, nous n'avons pas pu éliminer l'influence de l'acétone. Par contre, de nombreux essais nous ont montré que l'oxydation au mélange nitro-chromique, proposé par Cordebard (22) et Thivolle et Sonntag (23), présente de réels avantages, de même que certains inconvénients peu importants pour nous.

Pour nos essais, nous avons mélangé préalablement l'acide nitrique et la solution de dichromate de potassium. Lorsque l'acide nitrique est coloré, on élimine les vapeurs nitreuses par ébullition ou mieux encore, par passage à travers la solution d'un courant d'air pendant 10 minutes. L'acide nitrique Merck concentré ($D = 1,40$) est incolore, des essais effectués sur plusieurs échantillons de cet acide nous ont montré qu'ils ne renfermaient aucun produit susceptible de gêner le dosage de l'alcool. Le mélange nitro-chromique est assez stable (légèrement moins que le sulfo-chromique), même à chaud, si on a soin de le conserver dans un flacon brun, bouché à l'émeri. Dans ces conditions, le titre en dichromate diminue au maximum de 2 % en un mois.

Par une série d'essais avec différentes quantités d'acide nitrique, nous avons constaté que la concentration de cet

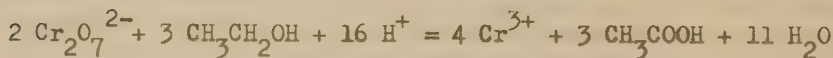
acide doit être entre 2 et 6 ml. HNO_3 conc. pour 8 ml. de solution totale. On a donc beaucoup plus de latitude que dans le cas du mélange sulfo-chromique. Nous avons néanmoins fixé des conditions précises d'oxydation, soit : 3 ml. HNO_3 ($D = 1,40$) pour 8 ml. de solution totale.

Nous avons suivi l'oxydation nitro-chromique par la polarographie du chrome VI (voir chap. 324) et l'oxydation sulfo-chromique par un dosage volumétrique en retour utilisant le sel de Mohr et le permanganate (Rochat). L'étude approfondie de l'oxydation de l'alcool éthylique seul et en présence de différents corps gênants fera l'objet d'un autre travail.

Retenons pour le moment seulement les deux faits suivants:

- 1) L'oxydation à basse température (25 à 30° C.) de 2 mg. d'éthanol avec le mélange sulfo-chromique exige environ 12 heures. Il ne faut qu'une heure avec le mélange nitro-chromique. Après 10 minutes, les 97 % environ de l'alcool sont déjà oxydés. On peut augmenter la vitesse de réaction en portant le mélange au bain-marie. La durée de la réaction est alors de 15 minutes.
- 2) A basse température (25 à 30° C.), on constate que l'acétone n'est pas oxydé par le mélange nitro-chromique, même en présence d'un grand excès de dichromate. A chaud, (au bain-marie) l'oxydation de l'acétone est moins marquée qu'en milieu sulfo-chromique. Pour un temps d'oxydation de 15 minutes, en présence d'une quantité égale d'acétone et d'alcool, le dosage de ce dernier présente une erreur d'env. + 3 % si l'on utilise de l'acide nitrique dans la concentration indiquée et d'env. + 15 % en présence d'acide sulfurique selon Rochat.

Equivalence alcool éthylique-dichromate de potassium. D'après l'équation stoechiométrique :



Il faut 4,26 mg. de dichromate de potassium pour oxyder 1 mg. d'alcool. Les différents auteurs sont en désaccord en ce qui concerne la quantité effectivement consommée, il est vrai que les conditions dans lesquelles ils opèrent sont quelque peu différentes.

TABEAU 18

Auteur	mg. $K_2Cr_2O_7$ pour oxyder 1 mg. d'alcool	Moyen d'oxydation
Schwarz (13)	4,30	sulfo-chromique
Wehrli (14)	4,06 *)	sulfo-chromique
Rochat (15)	4,30	sulfo-chromique
Nicloux (24)	4,82	sulfo-chromique
Thivolle et Sonntag (23)	4,82	nitro-chromique

Dans nos conditions de travail, la réaction est stoechiométrique, le facteur d'équivalence est de 4,26 mg. de $K_2Cr_2O_7$ par mg. d'alcool. Dans le cas de l'oxydation à froid, il est, semble-t-il, un peu plus élevé que dans l'oxydation à chaud, mais les différences sont négligeables.

Nous avons retenu l'oxydation nitro-chromique et nous avons cherché des moyens simples et précis pour le dosage de l'excès de dichromate dans ce milieu.

*) Remarque : Le chiffre correspondant aux indications de l'auteur dans son travail (14) est 4,30. Il nous a communiqué par la suite une modification que nous indiquons dans le tableau 18.

32.- LE DOSAGE POLAROGRAPHIQUE

321) Introduction.-

Basé sur les résultats de l'étude critique et de l'étude de l'oxydation de l'éthanol, nous proposons ici une méthode n'exigeant aucune solution exactement titrée, sauf une solution standard d'éthanol (voir chap. 213). Cette méthode est suffisamment sélective pour que l'acétone ne gêne pas (voir chap. 31) et elle évite toute erreur de virages. Elle comprend une distillation, une oxydation au moyen d'un excès de dichromate et une détermination polarographique de cet excès.

322) Distillation.-

Lors de l'étude critique, nous avons pu constater que la distillation avec réfrigérant en étain (14, 15) donne d'excellents résultats, aussi l'avons-nous retenue pour la méthode polarographique (voir fig. 3, voir page 66).

Afin de pouvoir comparer plus facilement le distillat des échantillons et des témoins, on reçoit presque 3,2 ml. de distillat par gramme de sang, puis on ajoute de l'eau distillée au moyen d'une pipette, afin d'obtenir exactement 3,2 ml. / g. sang. Ces mesures de volume doivent être faites avec minutie dans un cylindre gradué long correspondant au volume de distillat, car elles peuvent être à l'origine d'erreurs sensibles.

323) Oxydation.-

Nous avons retenu l'oxydation par voie nitro-chromique dans les conditions fixées au chap. 31. Nous avons déterminé la meilleure concentration du réactif en dichromate de potassium. Mais, comme cela dépend de la précision qu'on veut atteindre, nous donnons ces indications au chap. 325.

324) Polarographie.-

La réduction de l'ion chromate sur l'électrode à goutte a été étudiée par Lingane et Kolthoff (25). On obtient, en milieu alcalin (0,2 à 1-m. NaOH), une vague bien dessinée. Le courant de diffusion est proportionnel à la concentration de l'ion chromate et le potentiel de demi-vague est de $E_1 = -0,85$ v. par rapport à l'électrode de calomel saturé. Dans cette réac-

tion, le chrome (VI) est réduit en chrome (III).

Toutefois, seuls les résultats obtenus dans les mêmes conditions d'alcalinité sont comparables entre eux (Thanheiser et Willems, 26). On dispose d'une certaine latitude dans la préparation des solutions, par exemple, il n'est pas nécessaire que la densité de l'acide nitrique soit exactement de 1,40, à conditions toutefois qu'on utilise le même réactif pour la détermination de h_0, h_1 et h_x (voir ci-dessous).

Appareillage et conditions de travail.— Nous avons utilisé le polarographe Sargent XXI. L'erreur due à la température entre 15 et 25° est d'environ 1, 6 % par degré.

L'oxygène dissous peut être chassé par un courant d'hydrogène (10'), mais, dans les conditions de sensibilité auxquelles nous travaillons, cette opération n'est pas nécessaire, les erreurs dues à la présence de cet élément sont de 0,05 % entre 19 et 22°. La courbe polarographique de la réduction de chromate présente un palier plus ou moins incliné. La détermination de la hauteur devrait se faire par une construction graphique appropriée. Toutefois, en faisant varier la hauteur du réservoir de mercure, il est possible d'obtenir un palier parfaitement horizontal, ce qui permet une mesure directe de la hauteur de la vague.

La solution, après oxydation nitro-chromique, est parfaitement stable à l'air pendant 24 heures, qu'elle soit alcalinisée ou non. De nombreux essais ont montré que l'acide picrique qui peut être entraîné lors de la distillation ne provoque pas d'erreur sensible, même après ébullition prolongée.

Principe de la détermination polarographique de l'alcool.— Il s'agit d'un dosage indirect, par détermination polarographique de l'excès de dichromate. Pour éviter les erreurs dues entre autres au capillaire, à la hauteur du réservoir de mercure et au polarographe, nous procédons comme suit : on effectue le polarogramme d'un distillat ne renfermant pas d'alcool, auquel on a ajouté une quantité déterminée du mélange nitro-chromique, soit h_0 le saut de la vague polarographique. Dans un deuxième essai, on répète les mêmes opérations, mais en ajoutant la même quantité du mélange nitro-chromique au distillat d'un sang renfermant un pourcentage connu d'alcool d (par exemple, 1 0/00) (il se conserve pendant 3 semaines au frigorifique) et on obtient une hauteur h_1 due à l'excès de dichromate. $h_0 - h_1$ est proportionnel à la quantité de dichromate ayant été réduit par l'alcool renfermé dans le sang (1 0/00). On effectue alors la même opération sur le distillat d'un sang dont la teneur en alcool est inconnue ; soit h_x la hauteur de la vague polarographi-

que $(h_0 - h_x)$ est proportionnel à la teneur inconnue d'alcool) ;
le o/o d'alcool sera donné par la formule ;

$$x \text{ o/o} = \frac{(h_0 - h_x)}{(h_0 - h_1)} \cdot d.$$

Nous donnons un exemple d'un dosage dans la fig.4.

Polarogramme : dosage de l'éthanol

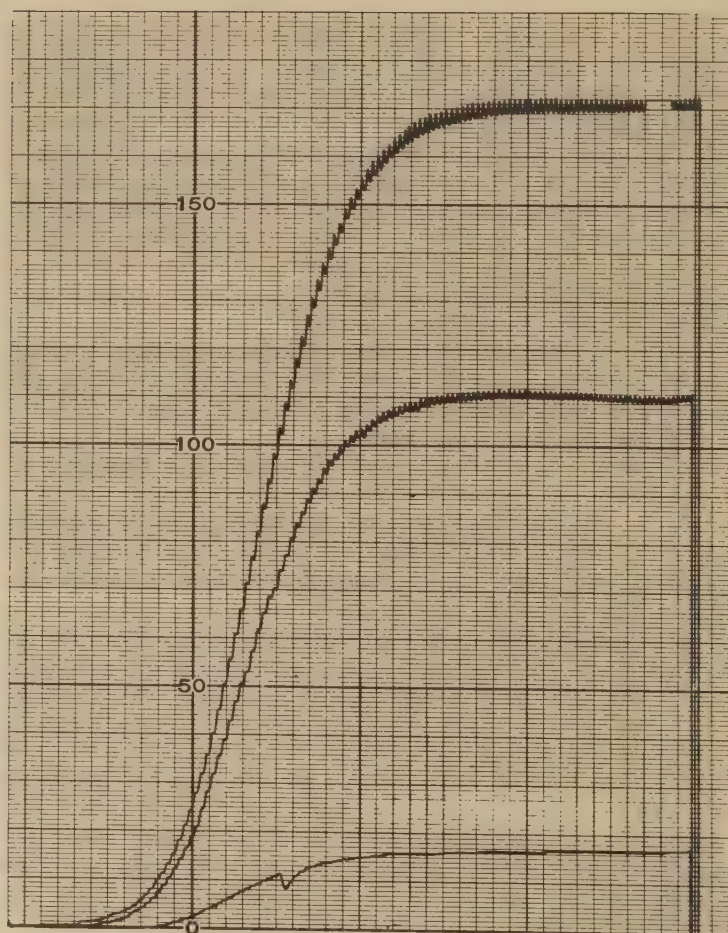


Fig. 4

324

Les deux premières mesures h_0 et h_1 ne se font qu'au début de chaque série d'essais, lorsqu'on renouvelle un réactif ou quand on modifie l'appareillage (capillaires, hauteur du réservoir de mercure, etc.). Si on utilise comme étalon, au lieu de sang alcoolisé, une solution d'alcool dans l'eau distillée, il faut déterminer expérimentalement un coefficient de correction pour h_1 (ce fait est dû sans doute à une légère différence des coefficients de diffusion).

325) Précisions.-

Considérations théoriques.- Les résultats du dosage de l'alcool dans le sang sont souvent destinés aux médecins et aux juristes et peuvent entraîner de graves conséquences. Il est donc indispensable que les chimistes puissent évaluer l'erreur de la méthode qu'ils utilisent et qu'ils l'indiquent en rendant les résultats : par exemple, $1 \pm 0,05$ o/oo ou $0,95$ à $1,05$ o/oo, afin d'éviter toute fausse interprétation. Nous allons donc rechercher les causes d'erreurs de la méthode. Beaucoup de facteurs peuvent en altérer les résultats, mais le processus que nous proposons permet d'en éliminer un certain nombre (par exemple, les erreurs dues au capillaire, à l'appareillage, à la solution-étalon, au coefficient de diffusion, etc.).

Nous devons, en tout premier lieu, examiner l'erreur due à la mesure polarographique, c'est-à-dire l'erreur commise sur la hauteur des sauts h_0 , h_x et h_1 . Nous admettrons, ce qui est proche de la vérité dans notre cas, que, quelle que soit la hauteur mesurée et quelle que soit sa valeur, nous fassions une même erreur de $\pm a$ ($h_0 \pm a$, $h_1 \pm a$, $h_x \pm a$).

Partant de la formule (1), les valeurs maximum ($X_{\max}$ o/oo) et minimum ($X_{\min}$ o/oo) sont données par les formules :

$$X \text{ o/oo max} = \frac{h_0 - h_x + 2a}{h_0 - h_1}; \quad X \text{ o/oo min} = \frac{h_0 - h_x - 2a}{h_0 - h_1}.$$

On peut en déduire l'erreur polarographique absolue E_A et l'erreur polarographique relative E_R en % :

$$E_A = \frac{\pm 2ad}{h_0 - h_1}$$

$$E_R = \frac{\pm 2a \cdot 100}{h_0 - h_x}$$

Pour avoir des erreurs absolues et relatives aussi faibles que possible, il faut donc que $(h_o - h_1)$ et $(h_o - h_x)$ soient aussi grands que possible, c'est-à-dire que, d'une part, le saut dû au dichromate avant l'adjonction d'alcool doit être grand et, d'autre part, l'excès de ce réactif doit être aussi faible que possible (h_x) après oxydation de l'alcool. Il s'agit donc de mettre un très léger excès de dichromate de potassium et de prendre une sensibilité telle que l'on obtienne pour h_o un saut aussi grand que possible. On prendra comme étalon une solution de concentration en alcool telle que h_1 soit à peu près égal à h_x . Il faut aussi considérer les autres erreurs (pesée, mesures de volume, distillation, oxydation). L'expérience montre que l'erreur de pesée est négligeable. Les autres peuvent être évaluées à $\pm 2\%$ au maximum.

Considérations pratiques.— Comme il n'est pas possible de travailler dans des conditions idéales, il nous a fallu rechercher celles qui permettent une détermination suffisamment précise et rapide.

Il a été effectué plusieurs séries d'essais. Dans chaque série, nous avons pris une quantité constante de dichromate et des quantités variables d'alcool et nous avons déterminé, d'une part, l'erreur expérimentale effectuée et, d'autre part, nous avons calculé l'erreur théorique polarographique E_R .

Figure 3

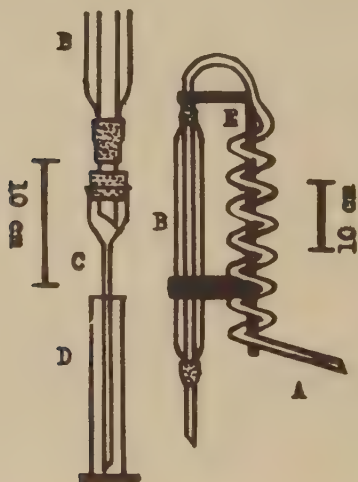


TABLEAU 19

Macro-polarographie : Analyse avec le réactif capable d'oxyder
3,25 o/oo.

Alcool dans le sang ‰	Résul- tats ‰	Erreur abs.	Erreur relat. %	Sensi- bilité a/mm	h_0	h_1	h_x	E_A	E_R
0,00	0,00	0,00	0,0	0,15	26,0	18,0	0,0	-	-
0,25	0,29	+ 0,04	+ 16,0	0,15	26,0	18,0	23,7	0,050	17,4
0,25	0,35	+ 0,10	+ 40,0	0,15	26,0	18,0	23,2	0,050	14,2
0,50	0,55	+ 0,05	+ 10,0	0,20	24,3	16,9	20,2	0,054	9,8
0,50	0,55	+ 0,05	+ 10,0	0,15	26,0	18,0	21,6	0,050	9,2
0,75	0,78	+ 0,03	+ 4,0	0,20	24,3	16,9	18,5	0,054	6,9
0,75	0,79	+ 0,04	+ 5,3	0,15	26,0	18,0	19,7	0,054	6,4
1,00	0,96	- 0,04	- 4,0	0,20	24,3	16,9	17,2	0,054	5,6
1,00	1,08	+ 0,08	+ 8,0	0,15	26,0	18,0	17,4	0,050	4,6
1,00	1,05	+ 0,05	+ 5,0	0,15	26,0	18,0	17,6	0,050	4,8
1,50	1,52	+ 0,02	+ 1,34	0,15	26,0	18,0	13,8	0,025	1,6
1,50	1,51	+ 0,01	+ 0,67	0,15	26,0	18,0	13,9	0,025	1,6
2,00	1,99	- 0,01	- 0,50	0,20	24,3	16,9	9,6	0,027	1,3
2,00	2,02	+ 0,02	+ 1,00	0,20	24,3	16,9	9,3	0,027	1,3
2,00	2,01	+ 0,01	+ 0,50	0,15	26,0	18,0	9,9	0,025	1,2
2,50	2,50	0,00	0,00	0,20	24,3	16,9	5,8	0,027	1,1
2,50	2,50	0,00	0,00	0,15	26,0	18,0	6,0	0,050	1,0
3,00	2,97	- 0,03	- 1,00	0,20	24,3	16,9	2,3	0,027	0,9
3,00	2,98	- 0,02	- 0,67	0,15	26,0	18,0	2,2	0,025	0,7
3,00	2,95	- 0,05	- 1,67	0,15	26,0	18,0	2,4	0,025	0,8

325

Remarque : Pour les faibles valeurs de $(h - h_0)$, nous avons pris l'erreur de lecture $a = \pm 0,2$ (ici, jusqu'à 1%). Pour les concentrations plus fortes, nous avons pris $a = \pm 0,1$. Aux valeurs de E_R , il faut encore ajouter les autres erreurs (2 à 3 %)

Dans une première série d'essais, nous procédons de la façon suivante : la quantité de dichromate ajoutée correspond à l'oxydation totale de 3,25 o/oo d'alcool. La distillation est conduite de telle sorte qu'on reçoive 3,2 ml. de distillat par gramme de sang. On prend alors 3 ml. de ce distillat qu'on analyse selon le procédé indiqué. Un calcul montre que si l'échantillon renferme 3,25 o/oo d'alcool, il faut, pour oxyder complètement ce dernier, 13 milligrammes de dichromate de potassium par g. de sang. Les résultats pour diverses teneurs d'alcool sont donnés dans le tableau 19.

Si on tient compte de toutes les erreurs, les résultats expérimentaux confirment ce que les calculs de l'erreur avaient révélé. Pour une quantité de dichromate choisie, l'erreur augmente rapidement lorsque les teneurs en alcool décroissent. Les résultats sont acceptables jusqu'à 1,5 à 2 o/oo d'alcool. Au-dessous de cette valeur, les erreurs atteignent ou dépassent 5 %.

Nous avons effectué une deuxième série d'essais avec des quantités initiales de dichromate de 10 milligrammes correspondant à 2,44 o/oo d'alcool dans le sang. Les résultats conduisent aux mêmes remarques. Les valeurs les meilleures sont obtenues pour des concentrations comprises entre 2 et 2,44 o/oo, ils sont acceptables jusqu'à 1 o/oo d'alcool. Pourtant, étant donné les normes fixées par la plupart des cantons, c'est au voisinage de 1 o/oo d'alcool dans le sang que les résultats doivent présenter le plus de précision. C'est pourquoi, nous avons effectué une troisième série d'essais avec une quantité de dichromate capable d'oxyder 1,3 o/oo d'alcool dans le sang. Dans ces conditions, les erreurs au voisinage de 1 o/oo sont inférieures à $\pm 0,5$ % (voir tableau 20).

TABLEAU 20

Macro-polarographie avec le réactif capable d'oxyder 1,30 o/oo.

Alcool dans le sang ‰	Résul- tats ‰	Erreur abs.	Erreur relat. %	Sensi- bilité a/mm	h_0	h_1	h_x	RN cm^3	E_A $a = \pm 1$	E_R $a = \pm 1$
0,00	0,00	0,00	-	0,15	17,25	4,45	17,25	1	-	-
0,30	0,31	+ 0,01	+ 3,3	0,10	19,90	4,15	15,04	1	0,013	4,1
0,30	0,31	+ 0,01	+ 3,3	0,15	17,25	4,45	13,30	1	0,016	5,0
0,60	0,59	- 0,01	- 1,7	0,15	17,25	4,45	9,70	1	0,016	2,7
0,60	0,60	0,00	-	0,15	17,25	4,45	9,56	1	0,016	2,6
0,60	0,62	+ 0,02	+ 3,3	0,10	19,90	4,15	10,19	1	0,013	2,0
1,00	1,00	0,00	-	0,10	19,90	4,15	4,09	1	0,013	1,3
1,05	1,05	0,00	-	0,15	17,25	4,45	3,80	1	0,016	1,5
1,20	1,20	0,00	-	0,10	19,90	4,15	0,69	1	0,013	1,0
1,32	1,34	+ 0,02	+ 1,5	0,15	34,50	21,70	17,32	2		
2,40	2,43	+ 0,03	+ 1,2	0,15	34,50	21,70	3,40	2		
2,50	2,55	+ 0,05	+ 2,0	0,15	34,50	21,70	1,85	2		
3,00	3,06	+ 0,06	+ 2,0	0,15	51,75	38,95	12,55	3		
3,00	2,99	- 0,01	- 0,33	0,10	59,70	43,95	12,60	3		
3,50	3,45	- 0,05	- 1,43	0,10	59,70	43,95	5,30	3		

326) Réactifs et mode opératoire.-

Réactifs utilisés :

Solution d'acide picrique à env. 0,85 %.

On la porte à ébullition pendant quelques minutes pour chasser les réducteurs volatils qu'elle pouvait contenir.

Acide nitrique puriss. Merck, D = 1,40.

On y fait passer un courant d'air sec pendant 15 minutes pour chasser les oxydes d'azote. A conserver dans un flacon brun.

RN.- Réactif nitro-chromique.

On dissout à froid 2,20 g. de $K_2Cr_2O_7$ pur dans 250 ml. d'acide nitrique conc. incolore.

Alcool absolu.

Pour la préparation des solutions-étalons (alcool absolu Merck ou alcool Bender et Hobein à 99,8 % Vol.). Voir chap. 213).

Soude caustique 4-n.

Mode opératoire :

1) Prise et distillation.- Le tube à essais bouché, renfermant le sang fluoré ou non, est sorti de la glacière et amené à la température du laboratoire. Si le sang est coagulé, on écrase le caillot avec une baguette de verre pendant que le tube est encore froid.

La pesée du tube, avant et après, doit se faire à 0,05 g. près pour 5 g. de sang (ce qui correspond à une erreur absolue sur l'alcool de 0,01 o/oo pour un sang renfermant 1 o/oo). Le sang est introduit dans un ballon pyrex à long col de 500 ml. On y ajoute, pour éviter la formation d'une mousse gênante lors de la distillation, 6,5 - 7,5 fois son volume d'une solution aqueuse d'un acide picrique. On recueille le distillat dans un cylindre gradué de 25 à 50 ml. (selon la quantité d'échantillon initial) renfermant un peu d'eau distillée dans lequel plonge le tube sortant du réfrigérant.

On reçoit légèrement moins que 3,2 ml. de distillat par g. de sang et on complète au volume (3,2 ml./g. de sang) par de l'eau distillée à l'aide d'une pipette.

Remarque.— Pour éviter la formation de mousse au cours de la distillation, le sang est additionné d'acide picrique ; or, il peut arriver que des traces de cet acide soient entraînées ; le distillat est parfois très légèrement coloré. Bien que les groupements nitrés soient réduits au polarographe, la quantité entraînée est trop faible pour que les résultats en soient altérés.

2) Essais préliminaires.— Il est nécessaire de connaître la quantité approximative d'alcool renfermée dans l'échantillon, afin de n'ajouter qu'un faible excès de dichromate de potassium. On effectue donc un essai préliminaire qui consiste à prendre une partie aliquote du distillat (5 ml.). On ajoute 3 à 5 ml. d'acide nitrique concentré et 1 ml. de réactif nitrochromique. On chauffe une minute. Si la solution reste jaunâtre, il y a excès de dichromate ; par contre, si on observe une coloration vert-bleuâtre, on ajoute un deuxième ml. de réactif nitrochromique et, par la suite, un troisième ml. si la solution n'est pas devenue jaunâtre. Dans le cas contraire, l'échantillon renferme plus de 3 o/oo d'alcool. On diluera pour se trouver dans les conditions de la méthode.

3) Oxydation de l'alcool par le dichromate.— On prélève 5 ml. du distillat, ajoute 1, 2 ou 3 ml. de réactif nitrochromique selon les résultats de l'essai préliminaire. On porte s'il y a lieu le volume à 8 ml. par addition d'acide nitrique concentré. On laisse reposer 1 heure, ou bien l'on chauffe pendant 5 minutes au bain-marie bouillant.

4) Polarographie de l'excès de dichromate.— Après oxydation, on prélève 2 ml. de la solution précédente. On y ajoute 4 ml. d'une solution d'hydroxyde de sodium 4-n. L'acide nitrique est ainsi neutralisé et l'excès de soude est de 0,94-m. On peut chasser l'oxygène par un courant d'hydrogène ou d'azote débarrassé d'oxygène et on polarographie avec une sensibilité de 0,15 μ a/mm. par milligramme, Damping 2, hauteur du mercure 45 cm., temps de goutte 3 sec.

Remarque.— L'expérience nous a montré que lorsqu'on ne chasse pas l'oxygène, l'erreur faite est négligeable.

327) Dosages sur le sang.-

Nous avons effectué plusieurs séries de dosages d'alcool sur des échantillons de sang alcoolisés in vivo et in vitro (voir chap. 214). La dernière série, alcoolisée in vitro a été effectuée en présence de quantités égales en acétone. Les résultats se trouvent dans le tableau 21.

TABLEAU 21

Macro-polarographie : Analyse de sang alcoolisé in vitro.

Alcool dans le sang ‰	Acétone dans le sang ‰	Résultats ‰	Erreur abs.	Erreur relat. %
0,60	2,00	0,61	+ 0,01	+ 1,7
0,80	2,00	0,82	+ 0,02	+ 2,5
1,00	2,00	1,01	+ 0,01	+ 1,0
1,00	6,00	1,02	+ 0,02	+ 2,0
1,50	6,00	1,54	+ 0,04	+ 2,7
1,50	6,00	1,48	- 0,02	- 1,3
2,00	2,00	2,01	+ 0,01	+ 0,5
2,00	4,00	1,98	- 0,02	- 1,0
2,50	4,00	2,53	+ 0,03	+ 1,2
3,00	4,00	2,93	- 0,07	- 2,3

328) Conclusions.-

L'erreur relative moyenne pour les essais sur le sang est de +0,7 %, les erreurs extrêmes pour des teneurs comprises entre 0,6 ‰ et 3,0 ‰ sont de - 2,3 % et + 2,7 %. La valeur de S_Z est de $1,15 \cdot 10^{-2}$ (voir chap. 216) et celle de Z est égale à $Z + 1,00 \cdot 10^{-2}$.

Cette méthode est donc exacte et plus précise que celles que nous avons examinées dans notre étude critique (voir aussi chap. 4).

Bien que, lorsqu'on travaille dans de bonnes conditions, c'est-à-dire lorsque la différence ($h_o - h_x$) est grande, les erreurs ne dépasseront pas ± 3 %, nous conseillons d'indiquer avec les résultats une marge d'erreur de ± 5 %.

Cette méthode n'est pas faussée par l'acétone quand on oxyde à froid et très peu seulement quand on procède à une oxydation rapide au bain-marie. Nous étudierons dans un travail ultérieur l'effet d'autres corps qui habituellement gênent le dosage de l'alcool. La méthode polarographique a été introduite dans la pratique médico-légale à Genève. On a apprécié le fait qu'elle n'utilise point de réactifs titrés et qu'on dispose, si on travaille avec un polarographe enregistreur, d'un graphique qui peut servir de témoin.

33.- LE MICRODOSAGE POLAROGRAPHIQUE

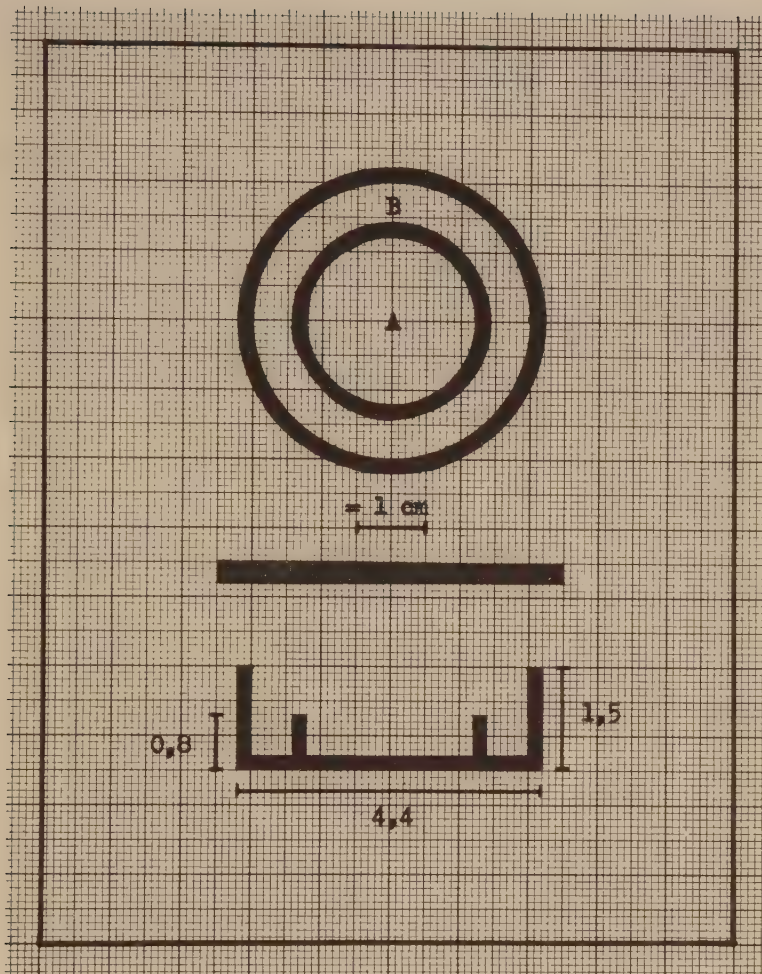
331) Introduction.-

La méthode polarographique est si sensible qu'il nous a été possible d'appliquer son principe à l'élaboration d'une micro-méthode utilisant 0,1 à 0,3 ml. de sang.

Cette méthode comprend une microdistillation isothermique (à la place de la distillation habituelle), une oxydation par un réactif nitro-chromique et une détermination polarographique de l'excès de chrome (VI).

332) Microdistillation isothermique.-

La distillation ordinaire présente des difficultés (grandes dilutions) si on l'applique à des échantillons de sang de l'ordre de 0,1 ml. Par contre, nous avons obtenu des résultats à 3 % près en entraînant l'alcool par un courant d'air chaud. Comme cette technique demande une surveillance rigoureuse et ne se prête guère à des dosages en grande série, nous avons effectué la microdistillation isothermique (appelée microdiffusion) dans des cuves de Conway (27). Leslie D. MacLeod (28) et Theodore Winnick (29) ont déjà utilisé cette technique pour des dosages volumétriques indirects de l'alcool. Pour nos essais polarographiques, nous avons fait faire des cuves de diffusion selon fig. 5. La partie extérieure A est destinée à recevoir le sang ou la solution aqueuse contenant l'alcool, et le liquide qui sert à rincer la pipette utilisée pour la mesure du sang. Pour favoriser la distillation de l'alcool, on y ajoute du carbonate de potassium qui favorise la séparation eau - alcool. Dans la partie A, on introduit le réactif nitro-chromique qui absorbe et oxyde (en acide acétique) les vapeurs d'alcool. On crée ainsi une différence de tension de vapeurs entre la partie A et B de la cuve. Le couvercle C ferme cette cuve et y est fixé par une graisse appropriée. Nous avons utilisé des cuves en verre.



332

Fig. 5

Cuve de microdiffusion utilisée dans les microdosages polarographiques et spectrophotométriques.

333) Oxydation.-

Nous avons employé l'oxydation par un réactif nitro-chromique (voir chap. 337). Ce réactif se prête bien à la microdiffusion à condition que la température ne dépasse pas 50° C. et que l'acide nitrique utilisé soit parfaitement incolore et sans réducteurs volatils (voir chap. 31).

334) Microdiffusion sur des solutions aqueuses d'alcool.-

Pour déterminer les conditions les meilleures de cette opération, nous avons étudié mathématiquement et expérimentalement le phénomène de microdistillation isothermique de l'éthanol dans notre réactif. Ainsi, nous pourrions fixer les conditions dans lesquelles cette opération doit être conduite. En appliquant à la microdiffusion les équations établies pour la vitesse de réaction du 1er ordre, on a :

$$A = A_0 (1 - e^{-K t}) \quad (I)$$

A_0 = quantité initiale d'alcool ; A = quantité d'alcool diffusée et oxydée au temps t .

Pour une valeur de $A = \frac{99}{100} A_0$ qui correspond à une erreur de $\pm 1\%$, l'équation (I) nous donne pour la valeur du temps :

$$t_{99/100} = \frac{4,6052}{K} \text{ sec.} \quad (II)$$

On admettra donc qu'après ce temps, la diffusion est quantitative à 1 % près.

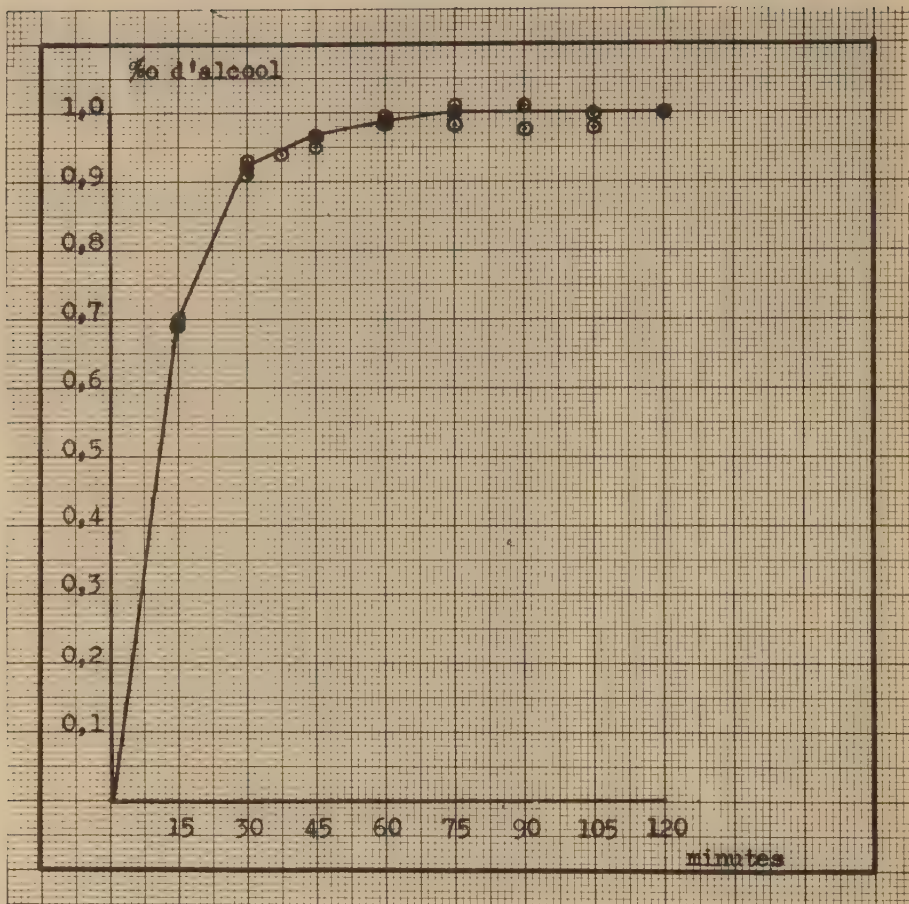
Dans cette équation, K est une constante. Pour vérifier dans quelle mesure notre distillation isothermique suit l'équation (I), une série de dosages a été effectuée sur des échantillons d'une solution aqueuse d'alcool à 1 o/oo et nous avons fait varier t entre 10 et 180 minutes. La température a été maintenue constante à 23° C. Dans le compartiment intérieur de nos cuves de microdiffusion, nous avons introduit (à l'aide d'une pipette jaugée à 2 traits) 0,5 ml. de réactif nitro-chromique (ce qui suffit pour oxyder 0,1 ml. d'une solution d'alcool à 1,3 o/oo). Dans la partie extérieure, nous avons déposé avec une pipette de glycémie, 0,1 ml. de la solution aqueuse d'alcool à 1 o/oo et 1 ml.

d'une solution saturée à froid de carbonate de potassium. Les points blancs de la fig. 6 représentent les o/oo d'alcool trouvés par analyse en fonction du temps. Le résultat théorique pour toutes les prises est de 1 o/oo. Les points noirs sont calculés d'après l'équation (I). Nous constatons une concordance des valeurs trouvées avec les valeurs calculées à environ $\pm 2\%$ près, ce qui correspond à l'erreur de la méthode d'analyse.

TABLEAU 22

Micro-polarographie : Analyse de solutions aqueuses d'alcool(0,1 ml.)

Résultats théoriques	Résultats obtenus par micro-polarographie	Erreurs abs.	Erreurs relat. %
0,250	0,255	+ 0,005	+ 2,00
0,500	0,494	- 0,006	- 1,20
0,750	0,742	- 0,008	- 1,07
1,000	0,986	- 0,014	- 1,40
1,000	0,991	- 0,009	- 0,90
1,250	1,257	+ 0,007	+ 0,56
1,250	1,259	+ 0,009	+ 0,72
1,500	1,523	+ 0,023	+ 1,53
1,750	1,721	- 0,029	- 1,66
1,750	1,722	- 0,028	- 1,60
2,000	1,976	- 0,024	- 1,20
2,250	2,234	- 0,016	- 0,71
2,750	2,700	- 0,050	- 1,82
3,000	3,032	+ 0,032	+ 1,07
3,500	3,464	- 0,036	- 1,03



334

Fig. 6

Micro-diffusion sur des solutions aqueuses d'éthanol : valeurs calculées - résultats obtenus.

Comme le phénomène en question suit bien l'équation (I), nous pouvons calculer la constante K et le temps t nécessaire pour que la réaction soit complète à $\pm 1\%$ près (équation II). Ainsi, nous avons trouvé pour nos conditions d'expérience $K = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ et $t = 59$ minutes (approximations).

Pour accroître la vitesse de la diffusion, la température a été portée à 50°C ., mais il semble bien que dans ces conditions, la valeur de K n'est pas beaucoup modifiée par rapport à la diffusion à 23°C . Nous avons effectué une série d'analyses sans adjonction de carbonate de potassium dans la partie extérieure de la cuve et constaté une sensible diminution de la constante K ; le temps de l'opération complète était alors plus que doublé. On n'observe pas d'amélioration lorsqu'on augmente la surface de la solution aqueuse d'alcool par l'introduction d'un anneau de papier filtre dans le compartiment extérieur de la cuve.

Plusieurs graisses (assurant l'étanchéité de la cuve) ont été examinées. Elles doivent présenter des qualités d'adhérence, ne pas émettre de vapeurs réductrices, résister au réactif et avoir un point de fusion supérieur à 60°C . Nous avons retenu la graisse solide pour rodages K.W.S. de la maison M. Jaeger à Genève, qui présente toutes ces qualités.

335) Microdiffusion sur le sang.-

Nous avons effectué des analyses sur des échantillons de sang contenant de l'alcool. Il est préférable d'utiliser pour de si petites quantités (0,1 ml.) du sang alcoolisé in vivo, car le mélange de l'alcool au sang in vitro présente la difficulté d'homogénéisation. Les échantillons provenaient des prises de sang de la police, faites par veinotubes fluorés. La macrométhode polarographique et la méthode volumétrique de Rochat ont été pratiquées en parallèle. Nous avons fait une série d'analyses sur des prises de 0,1 ml. du même sang fluoré contenant environ 1 o/oo d'alcool, le temps de diffusion étant compris entre 10 et 180 minutes. Les courbes obtenues (o/oo d'alcool trouvés en fonct. du temps) ne sont pas régulières et leur forme ne correspond pas à l'équation (I). Pour une température de 23°C ., la diffusion n'est pratiquement terminée qu'après 180 minutes, bien que nous ayons ajouté - comme dans les essais précédents - du carbonate de potassium. On constate que le sang exerce un effet de rétention de l'alcool. Nous avons pu diminuer ce phénomène en portant la température de réaction à 50°C . Dans ce cas, le temps de la distillation isothermique pratiquement complète

est d'environ 120 minutes. Pour avoir une marge suffisante, nous effectuons la diffusion à 50° C. pendant 2 heures $\frac{1}{2}$ au minimum.

Pour mesurer 0,1 ml. de sang fluoré, nous avons essayé plusieurs sortes de pipettes. La pipette à glycémie (contrôlée, soigneusement lavée et séchée), se prête très bien à cette détermination à condition qu'elle soit rincée par un liquide ajouté ensuite dans la cuve. Or, la solution saturée de carbonate de potassium qu'on introduit aussi dans le compartiment extérieur de la cuve, se prête mal à ce rinçage, car elle fait coaguler le sang dans la pipette. Pour cette raison, nous introduisons d'abord environ 0,8 ml. d'eau bidistillée dans la cuve, ensuite 0,1 ml. de sang, et on rince la pipette avec cette eau. L'hémolyse qui se fait lors du mélange du sang à l'eau s'est révélée favorable à la distillation de l'alcool. Pour saturer ce mélange, en carbonate de potassium, on ajoute environ 0,5 ml. d'une solution saturée de K_2CO_3 qui contient un excès de ce sel en suspension (pour la préparation, voir chap. 337). Pour le sérum et pour le plasma, on procédera de la même façon.

Dans le tableau 23, nous comparons les résultats ainsi obtenus avec les résultats moyens obtenus par les deux macrométhodes mentionnées.

TABLEAU 23

Micro-polarographie : Analyse de sang alcoolisé in vivo.

Moyenne des résultats obtenus par la méthode Rochat et macro-polarographie	Résultats obtenus par micro-polarographie	Diff. abs.	Diff. relat. %
0,323	0,333	+ 0,010	+ 3,10
0,500	0,489	- 0,011	- 2,20
0,570	0,558	- 0,012	- 2,11
0,723	0,735	+ 0,012	+ 1,66
0,949	0,965	+ 0,016	+ 1,69
0,990	1,000	+ 0,010	+ 1,01
1,003	0,990	- 0,013	- 1,29
1,023	1,012	- 0,011	- 1,07
1,186	1,194	+ 0,008	+ 0,68
1,565	1,514	- 0,051	- 3,26
1,932	1,877	- 0,055	- 2,85
2,255	2,229	- 0,026	- 1,15
2,730	2,797	+ 0,067	+2,46
3,011	3,063	+ 0,052	+ 1,73
3,464	3,515	+ 0,051	+ 1,47
*) 1,025	1,038	+ 0,013	+ 1,27
*) 1,140	1,170	+ 0,030	+ 2,63
*) 1,165	1,164	- 0,001	- 0,09
*) 1,000	0,995	- 0,008	- 0,80
*) 0,945	0,939	- 0,006	- 0,64

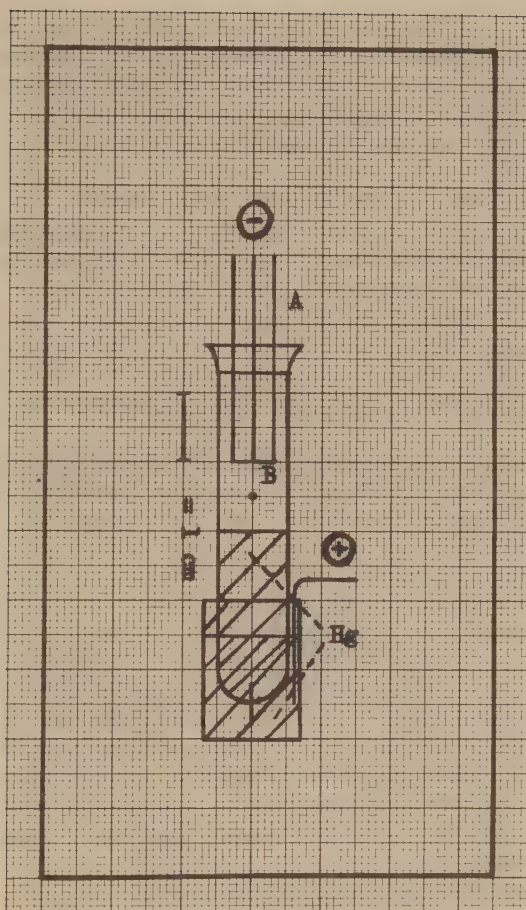
335

Dosages effectués sur des échantillons de sang veineux fluoré (prises de 0,05 et de 0,1 ml.*). Les essais 16 à 20 ont été préparés par un autre institut et effectués en parallèle par 6 instituts. Nous avons ajouté 1 o/oo d'acétone aux essais 4, 7 et 10.

336) Polarographie.-

Si l'on travaille selon le mode opératoire indiqué dans le chap. 337, on se trouve dans les mêmes conditions polarographiques que pour la macro-méthode (voir chap. 324).

Pour alcaliniser, après l'oxydation, on ajoute au réactif contenu dans le compartiment A de la cuve de diffusion, exactement deux fois son volume de soude caustique 4 N. L'acide nitrique est ainsi neutralisé et l'excès de soude est d'environ 0,94 M. On mélange et transvase ce liquide à l'aide d'une pipette (pas quantitativement) dans une petite cuve polarographique. Nous avons fabriqué dans ce but une série de cuves spéciales (fig. 7).



336

A = Capillaire

B = Liquide à analyser

Fig. 7

Cuves polarographiques utilisées pour le microdosage.

337) Réactifs et mode opératoire.-

1) Solution aqueuse d'éthanol.

Voir chap. 213.

2) Réactif nitro-chromique.

Dans un ballon jaugé de 250 ml., on introduit environ 100 ml. d'eau bidistillée. On y dissout environ 0,277 g. de dichromate de potassium et ajoute 94 ml. d'acide nitrique pur. (D = 1,40) incolore, on complète à 250 ml. avec de l'eau bidistillée.

0,5 ml. de ce réactif peut oxyder l'alcool contenu dans 0,1 ml. de sang renfermant 1,3 % (poids) d'alcool. Cette solution sera gardée dans un flacon brun. Il n'est pas nécessaire d'en connaître le titre exact.

3) Soude caustique 4 N.

4) Solution-suspension de carbonate de potassium.

à 100 ml. d'eau distillée, on ajoute environ 200 g. de K_2CO_3 et on chauffe pendant quelques minutes. La partie non soluble du sel sera mise en suspension par agitation avant l'emploi.

Mode opératoire.-

Diffusion :

Pour chaque analyse, on dispose de 3 cuves de diffusion identiques, A, B et C, préalablement lavées au mélange chromique, rincées à l'eau et à l'eau distillée et séchées. Les bords de ces cuves sont enduits d'une graisse à robinet inerte (voir chap. 334). Pour faciliter cette opération, on utilise un papier enduit d'une mince couche de graisse qu'on applique sur les bords des cuves.

A l'aide de pipettes contrôlées (0,5 et 1,0 ml.) ou d'une microburette, on introduit dans la partie centrale de chaque cuve le réactif nitro-chromique. Dans la cuve A, 0,50 ml., dans B, 1,00 ml., dans C, 1,50 ml. Dans le compartiment extérieur de chaque cuve, on introduit environ 0,5 ml. d'eau bidistillée et exactement 0,10 ml. de sang fluoré ou de sérum (pipette de glycémie). On rince la pipette trois fois par aspiration d'eau bidistillée. On mélange le sang et l'eau pour favoriser l'hémolyse et on ajoute finalement environ 0,5 ml. de la solution-suspension

de carbonate de potassium. Les cuves sont munies de leurs couvercles et introduites dans l'étuve à $45 - 50^{\circ} \text{C}$. Au bout de 2 heures $\frac{1}{2}$ (on peut attendre jusqu'à 10 heures), on sort les cuves de l'étuve et on les examine sur un fond blanc. Seule la cellule contenant la plus petite quantité de réactif tout en restant jaunâtre sera soumise à l'analyse. Un exemple : la cuve A a viré au vert-bleuâtre, ce qui signifie qu'il y avait une insuffisance de dichromate ; B est resté jaunâtre et C a conservé une grande partie de sa coloration jaune initiale. On en conclut que l'échantillon soumis à l'analyse renferme plus de 1,3 o/oo d'alcool, mais moins de 2,6 o/oo. Dans ce cas, le dosage se poursuivra sur la cuve B.

Essais de comparaison :

Pour chaque série d'analyses, on fait un essai à blanc qui donne la hauteur de la vague polarographique H_0 due au réactif seul. De même, on fait un essai sur un échantillon de la solution standard de 1 o/oo d'alcool (0,5 ml. de réactif), qui donne la hauteur H_1 .

Polarographie de l'excès de dichromate de potassium :

Dans la partie centrale de la cuve soumise à la suite du dosage, on introduit à l'aide de pipettes jaugées ou d'une microburette, un volume double de réactif en NaOH 4 N, donc 1, 2 ou 3 ml. selon la cuve (A, B ou C). On mélange à l'aide d'une pipette étirée qu'on utilise ensuite pour le transvasage du liquide alcalinisé, dans la cuve polarographique (qui n'a pas besoin d'être quantitatif). Nous avons travaillé dans les conditions polarographiques suivantes : L'oxygène a été éliminé par un courant d'hydrogène (10 min.). Sensibilité $0,15 \mu\text{A/mm}$. ; damping 2 ; hauteur du mercure 30 cm. ; temps de goutte 3 sec.

Calculs :

H_x = hauteur de la vague polarographique de la prise à analyser ;

n = unités de réactif nitro-chromique contenues dans la cuve (= 0,50 ml.).

Pour 1 ml. de réactif, n est donc 2.

$$x \text{ (o/oo)} = \frac{(H_0 - H_x)}{(H_0 - H_1)} n \cdot d \quad (\text{g./lt.})$$

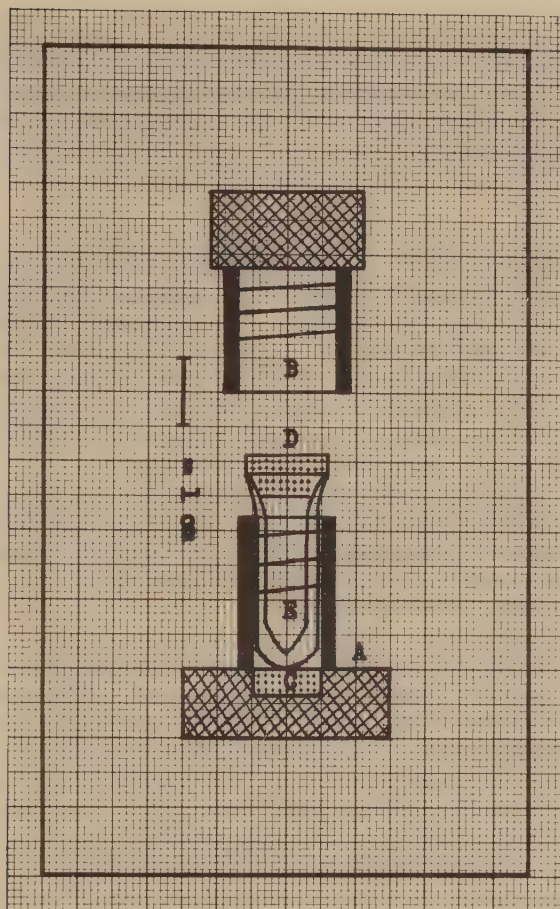
d = concentration de la solution d'alcool utilisée (o/oo poids).
Pour la solution standard de 1 o/oo, d est égale à 1.

Pour avoir le résultat exprimé en g. d'alcool par kg. de sang, il faut diviser le résultat obtenu selon la formule précédente, par la densité moyenne du sang qui est de 1,058. Si l'on a effectué le dosage dans le sérum et qu'on veut exprimer le résultat en g. d'éthanol par kg. de sang complet, on divise le résultat obtenu par 1,03 (poids spéc. moyen du sérum), puis par 1,2 (facteur déterminé expérimentalement qui corrige la répartition inégale de l'alcool entre les globules et le sérum.

Prélèvement du sang :

On peut pratiquer ce microdosage sur les échantillons de sang veineux habituels. Si le sang a été fluoré, on prélève du sang complet ; dans le cas où il serait coagulé, on prélèvera du sérum obtenu après centrifugation.

Pour éviter la prise de sang dans la veine, nous proposons la technique suivante : Désinfecter l'oreille ou le bout du doigt par une solution de sublimé à 1 %. Essuyer avec un morceau de coton, faire une incision à la lancette (dont la pointe a été désinfectée par la chaleur), enlever la première goutte de sang avec du coton et recueillir quelques gouttes dans le récipient (fig. 8) qui contient quelques cristaux de fluorure de sodium. Fermer le couvercle et secouer pendant une minute. Apposer l'étiquette et envoyer le récipient au laboratoire.



A = Support de protection p.e. en aluminium ; B = Couvercle qui se visse sur A ; C = Rondelle de caoutchouc qui favorise la fermeture hermétique ; D = Bouchon en matière plastique ; E = tube contenant le sang fluoré.

337

Fig. 8

Réceptient pour la prise de sang au bout du doigt.

338) Précision.-

Comme on effectue la polarographie dans les conditions de la macro-méthode, nous renvoyons pour les indications concernant la précision au chap. 325.

Marge d'erreur :

Nous admettons une erreur totale max. de $\pm 5\%$. Lorsqu'on travaille dans de bonnes conditions, c'est-à-dire que la différence ($H_0 - H_x$) est grande, les erreurs dépassent rarement $\pm 3\%$. Il est curieux de constater que la microméthode présente à peu près la même marge d'erreur que la macro-polarographie. Cela provient surtout du fait que dans la première, le nombre des mesures de volumes est considérablement diminué.

Dans les erreurs évaluées sont incluses celles provenant de la mesure du volume de la prise par la pipette à glycémie, des mesures de volumes du réactif et de la soude, de l'appareil, ainsi que l'erreur commise lors de la mesure des hauteurs des vagues polarographiques.

Si l'on fait le dosage sur des échantillons de sang, une autre erreur vient s'ajouter. Cette erreur est due à des différences de la densité des échantillons de sang. La densité du sang complet peut varier entre 1,045 et 1,075 (30). Pour les calculs, nous utiliserons une valeur probable de 1,058. On peut donc commettre une erreur supplémentaire d'environ $\pm 1,5\%$. Nous arrivons ainsi à une erreur max. totale de $\pm 3,5\%$. Pour plus de sécurité, nous admettons une marge d'erreur de $\pm 5\%$. Nous ne l'avons jamais atteinte lors de nos expériences (tableaux 1 et 2).

La concentration du réactif varie ; il est avantageux de la choisir telle que 0,50 ml. oxydant environ 0,3 o/oo d'alcool de plus que la teneur dans le sang admise par les autorités (1,3 o/oo pour une limite admise de 1 o/oo). Ainsi, on travaille dans des conditions telles que la zone la plus intéressante du point de vue médico-légal correspond au domaine le plus précis de l'analyse.

Sang veineux et sang capillaire :

R.N. Harger, R.B. Forney et R.S. Baker (31) publient des résultats d'alcoolémie trouvés sur le sang veineux et sur le sang capillaire. Ils ont constaté que si le temps entre la dernière ingestion d'alcool et la prise de sang est inférieur à 70 minutes, le o/oo d'alcool dans le sang capil-

laire est plus fort que celui du sang veineux, cette élévation du taux d'alcool peut atteindre 22 %. Au bout de 70 minutes après la dernière ingestion, les teneurs en alcool trouvées pour le sang capillaire et veineux sont identiques. Nous avons commencé une série d'expériences pour vérifier ces indications, qui sera publiée dans un travail ultérieur.

Si l'on dose l'alcool en présence d'acétone en quantité égale, l'erreur max. constatée est de + 3 % en plus de celle de la méthode. La sélectivité vis-à-vis d'autres corps sera encore à vérifier.

339) Conclusions.—

Le micro-dosage nécessite env. 0,2 à 0,4 ml. de sang fluoré. Il s'effectue à l'aide de verreries simples et peu coûteuses et se prête facilement à des dosages en grandes séries. La méthode ne peut s'introduire que dans les laboratoires qui disposent d'un polarographe.

L'erreur moyenne relative est petite ($- 0,17\%$) ; les erreurs extrêmes peuvent atteindre théoriquement $\pm 3,5\%$. En pratique (voir tableau 23), elles ont atteint $- 3,26\%$ et $+ 3,10\%$. La valeur de s_z (voir chap. 216) est de $1,95 \cdot 10^{-2}$ et celle de $\bar{z}$ est égale à $0,05 \cdot 10^{-2}$. Cette méthode est donc très précise et exacte. Pour la comparaison avec les autres méthodes, voir chap. 4.

Il faut cependant admettre que cette méthode est plus délicate que celle du macro-dosage polarographique et qu'il est plus difficile d'éviter complètement l'influence de l'acétone.

34.- LE MICRO-DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE

341) Introduction.—

Les laboratoires qui ne possèdent pas de polarographe peuvent tout de même effectuer les dosages d'éthanol selon la méthode précédente (chap. 32 et 33), en remplaçant le dosage polarographique de l'excès de chrome VI par un dosage spectrophotométrique.

L'examen des courbes d'absorption du chromate, du dichromate et du chrome III, établies par Englis et Wollerman (33), montre que les combinaisons du chrome VI absorbent au voisinage de 366 nm dans l'ultra-violet proche, tandis que le chrome III est "transparent" pour cette même longueur d'ondes, du moins pour les concentrations auxquelles nous aurons à faire.

342) Réactifs et mode opératoire.

On utilise les mêmes réactifs que pour la micro-méthode polarographique (voir chap. 337).

Pour la diffusion et les essais de comparaison, voir chap. 337.

Détermination spectrophotométrique:

Dans la partie centrale des cuves (essais à blanc qui fournit D_0 , essais 1 o/oo qui donne D_1 et analyses D_x), on ajoute, à l'aide de pipettes jaugées ou d'une microburette, un volume double de NaOH 4 N. Après avoir bien mélangé, on prélève exactement 1 ml. de ce mélange alcalinisé et on dilue 10 fois avec de l'eau distillée.

Ces solutions stables pendant 8 heures sont transférées dans des cuves spectrophotométriques en verre d'un diamètre de 10 mm. Le spectrophotomètre est réglé à zéro avec une cuve contenant de l'eau distillée, puis on mesure la densité optique D pour chaque solution.

Si, après la diffusion, on procède immédiatement au dosage spectrophotométrique, il n'est pas nécessaire d'alcaliniser. Dans ce cas, on peut remplacer la soude caustique 4 N par de l'eau distillée et on continue comme indiqué.

Calculs.

Densité optique pour 0 o/oo (g./lt.) = D_0

Densité optique pour 1 o/oo (g./lt.) = D_1

Densité optique pour x o/oo (g./lt.) = D_x

n = unités de réactif nitro-chromique contenues dans la cuve de diffusion (= 0,50 ml.). Pour 1 ml. de réactif, n est donc 2.

d = concentration de la solution d'alcool utilisée (g./lt.). Pour la solution standard de 1 o/oo, d est égale à 1.

$$x \text{ (g./lt.)} = \frac{(D_0 - D_x)}{(D_0 - D_1)} \cdot n \cdot d$$

Pour exprimer le résultat en g. d'éthanol par kg. de sang (voir chap. 337) :

$$\text{Résultat (o/oo poids)} = \frac{x}{1,058}$$

TABEAU 24

Micro-spectrophotométrie : Analyse de sol. aqueuses d'alcool.

Valeurs réelles en ‰	Valeurs trouvées en ‰	Ecart absolu	Résultats moyens	Ecart moyen abs.	Ecart moyen relat.	Erreurs m. abs.	Erreurs m. relat. %	Erreurs extrêmes %
0,200 0,200	0,193 0,197	0,002 0,002	0,195	0,002	1,03	- 0,005	- 2,50	- 1,5 - 3,5
0,500 0,500	0,500 0,508	0,004 0,004	0,504	0,004	0,79	+ 0,004	+ 0,80	0 + 1,6
1,000 1,000 1,000 1,000	0,995 1,001 0,991 1,003	0,003 0,003 0,007 0,005	0,998	0,005	0,50	- 0,002	- 0,20	- 0,9 + 0,1
1,200 1,200 1,200	1,207 1,219 1,216	0,007 0,005 0,002	1,214	0,004	0,33	+ 0,014	+ 1,17	+ 0,6 + 1,6
1,800 1,800	1,750 1,829	0,039 0,040	1,789	0,040	2,24	- 0,011	- 0,61	+ 1,6 - 2,8
2,000 2,000	1,970 1,956	0,007 0,007	1,963	0,007	0,36	- 0,037	- 1,85	- 1,5 - 2,2

343) Mesure spectrophotométrique.-

Dans les limites de concentration de la méthode proposée, la coloration obéit à la loi de Lambert-Beer. La densité optique est proportionnelle à la concentration du bichromate ou du chromate.

Pour cette détermination, il faut disposer d'un spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures de la densité optique dans l'ultra-violet proche, susceptible de donner un rayonnement monochromatique de longueur d'ondes voisine de 366 nm. Il n'est pas nécessaire pour cela d'avoir un appareil spécialement conçu pour les mesures dans l'ultra-violet. Certains colorimètres construits pour le visible permettent d'atteindre l'ultra-violet proche. C'est ainsi que nous avons utilisé le spectrophotomètre "Eppendorf" qui, grâce à l'emploi d'une lampe à mercure et d'un filtre de Wood, laisse passer les radiations de $\lambda = 366 \text{ m}\mu$.

Les considérations théoriques concernant la précision exposées dans les chap. 325 et 338 sont aussi valables pour cette méthode micro-spectrophotométrique.

Les résultats obtenus pour des solutions aqueuses d'alcool (préparées selon chap. 213) se trouvent dans le tableau 24.

344) Analyses sur le sang.-

Nous avons effectué une série de dosages sur des échantillons de sang veineux fluoré alcoolisé in vivo (prises de sang de la police). Dans le tableau 25, nous comparons ces résultats à la moyenne obtenue par la méthode Rochat et la macro-polarographie.

Pour la concordance des résultats trouvés sur le sang capillaire avec ceux du sang veineux, nous renvoyons au chap. 338.

TABLEAU 25

Micro-spectrophotométrie : Analyse de sang alcoolisé in vivo.

Moyenne des résultats obtenus par la méthode Rochat et macro- polarographie	Résultats obtenus par micro-spectrophotométrie	Diff. abs.	Diff. relat. ‰
0,389	0,400	+ 0,011	+ 2,83
0,559	0,573	+ 0,014	+ 2,51
0,816	0,827	+ 0,011	+ 1,35
0,906	0,925	+ 0,019	+ 2,10
0,989	0,972	- 0,017	- 1,77
1,056	1,034	- 0,022	- 2,08
1,143	1,164	+ 0,021	+ 1,84
1,670	1,627	- 0,043	- 2,57
1,938	1,871	- 0,067	- 3,46
2,435	2,397	- 0,038	- 1,56
2,887	2,949	+ 0,062	+ 2,15
3,249	3,327	+ 0,078	+ 2,40

345) Conclusions.-

C'est une méthode analogue à la micro-polarographie (conclusions, voir chap. 339).

Elle est légèrement moins précise et exacte que la première, mais un peu plus rapide.

L'erreur moyenne relative est $+ 0,31 \%$; les erreurs extrêmes atteignent $- 3,46 \%$ et $+ 2,83 \%$ (tableau 25). La valeur de s_Z (voir chap. 216) est de $2,23 \cdot 10^{-2}$ et celle de $\bar{Z}$ est égale à $+ 0,07 \cdot 10^{-2}$.

La méthode se prête très bien à des dosages en grande série.

4.- CONCLUSIONS FINALES

Nous tenterons une comparaison des méthodes en usage contrôlées par nous et de celles que nous avons mises au point. Cette comparaison se trouve dans le tableau 26 et la fig.9.

$E_{\%}$ = Erreur moyenne relative en % pour toutes les valeurs trouvées pour les essais sur le sang (mesure de l'exactitude).

$E \text{ max.}\%$ = L'erreur max. exprimée en % que nous avons constatée lors de cette série d'essais (mesure de ce qu'on pourrait appeler "sécurité").

s_Z = L'écart type (déviation standard) que nous avons calculé à l'aide de la statistique mathématique (mesure de la précision).

$\bar{Z}$ = Valeur moyenne des Z_i ; ces derniers exprimant le rapport erreur absolue / résultat théorique (mesure de l'exactitude).

Lim. fid. à 1 % = Limite "fiduciaire" ou limite de confiance à 1 %. Ce sont les limites supérieure et inférieure telles qu'on peut admettre qu'avec une probabilité de 99 sur 100, les résultats obtenus sont situés entre ces limites.

Ces limites sont égales à $\bar{Z} \pm t_{0,01} \cdot s_Z$.

$t_{0,01}$ dépend du nombre d'essais effectués et leurs valeurs sont données dans des tables (11).

Un exemple :

Nous trouvons par la méthode Rochat une alcoolémie de 0,50 o/oo (poids). Quelle marge d'erreur devons-nous indiquer avec ce résultat pour que la valeur réelle s'y trouve avec une probabilité de 99/100 ?

Dans le tableau 26, nous trouvons pour cette méthode :

$$\text{Lim. fid. 1 \%} = \bar{Z} \pm t_{0,01} \cdot s_Z = (-2,19 \pm 3,61) \cdot 10^{-2}.$$

$$\text{Donc pour les } Z_{\text{fid.}} : -5,80 \cdot 10^{-2} \text{ et } +1,42 \cdot 10^{-2}.$$

Comme par définition (chap.216): $(Y_i) = (Z_i) \cdot (X_i)$, nous aurons $\text{lim. fid. 1 \%} =$

$$-5,80 \cdot 0,50 \cdot 10^{-2} \text{ et } +1,42 \cdot 0,50 \cdot 10^{-2}$$

et le résultat sera à exprimer comme suit :

$$0,5 \begin{cases} + 0,007 \\ - 0,029 \end{cases} \quad \text{o/oo (poids)}$$

ou bien :

alcoolémie entre 0,471 et 0,507 o/oo (poids).

Pour faciliter ces calculs approximatifs, et en même temps pour comparer les méthodes, nous indiquons dans la fig. 9 à l'aide d'un graphique les valeurs suivantes en fonction de la valeur réelle :

- 1) le résultat moyen (p.e., droite désignée par 25)
- 2) la limite de confiance 1 % supérieure (p.e., 25')
- 3) la limite de confiance 1 % inférieure (p.e., 25'')

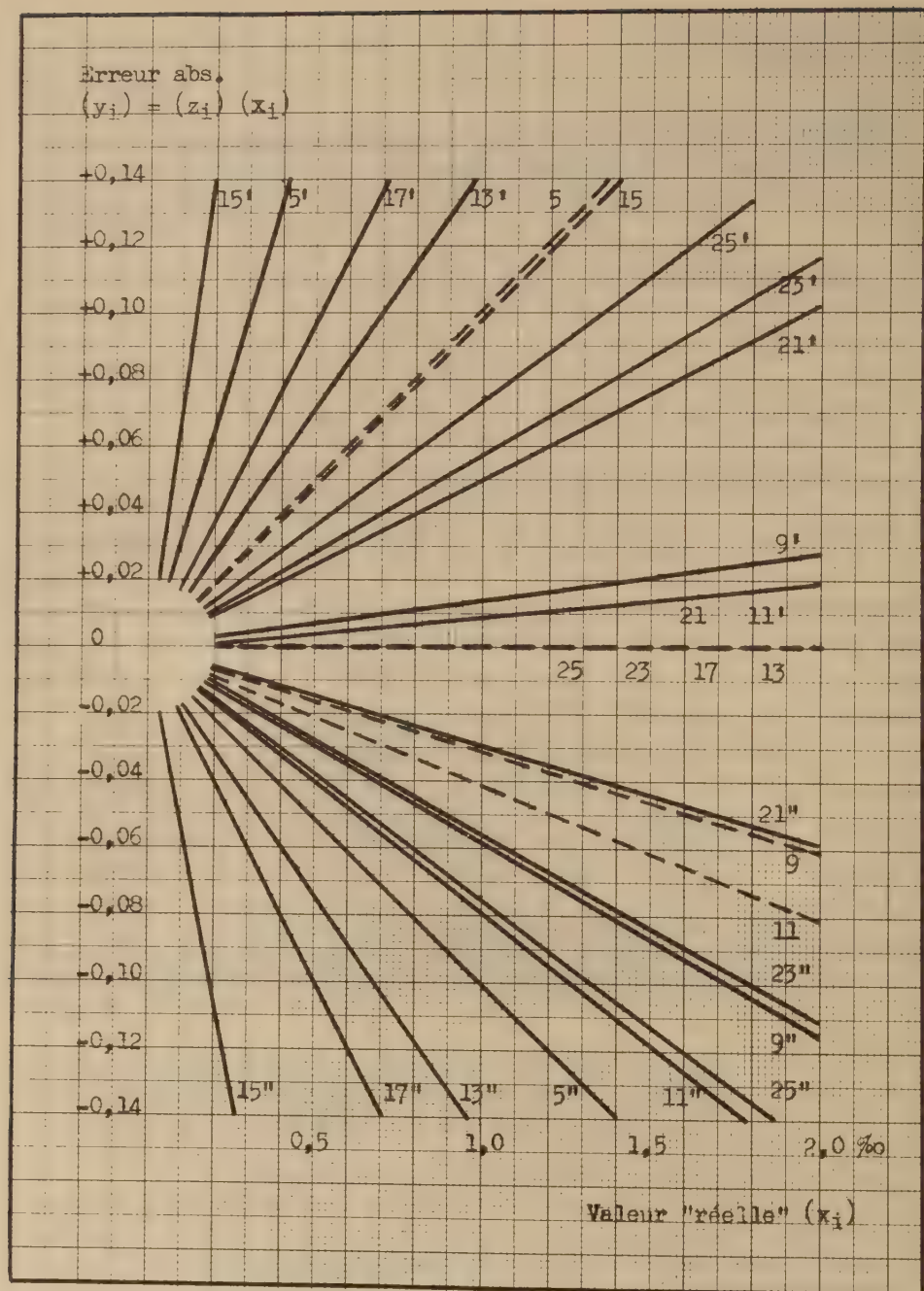
Les numéros des droites dans ce graphique se rapportent aux numéros des tableaux sur lesquels ces calculs sont basés.

Pour mieux égaliser les conditions, nous n'avons utilisé pour les calculs statistiques que les valeurs comprises entre 0,40 et 2,00 o/oo.

TABLEAU 26

Comparaison de l'exactitude et de la précision des méthodes contrôlées et des dosages proposés.

Méthodes	Tableau No	$\bar{E}_{\%}$	$E_{\max. \%}$	s_z • 100	Lim. fid. 1%	
					$\bar{z}$ • 100	$\pm t_{0,01} \cdot s_z$ • 100
Nicloux - dir.	5	+ 12,58	+ 22,00	6,86	+ 12,66	23,00
Rochat	9	- 1,76	- 3,80	1,27	- 2,19	3,61
Schifferli	11	- 3,50	- 6,00	1,45	- 3,42	4,49
A D H	13	- 0,42	- 6,99	4,32	- 0,13	14,51
Drunkometer	15	+ 11,37	+ 50,00	21,44	+ 10,88	61,35
Breathalyzer	17	- 0,14	- 9,70	6,65	- 0,13	19,80
Polarographie	21	+ 0,70	+ 2,70	1,15	+ 1,00	4,03
Micro-polarographie	23	- 0,17	- 3,26	1,95	+ 0,05	5,76
Micro-spectrophotom.	25	+ 0,31	- 3,46	2,23	+ 0,07	7,48



4 b

Fig. 9

Résultats moyens et limites de confiance 1 % pour toutes les méthodes examinées (statistique).

Il est bien entendu que les valeurs statistiques données ci-dessus ne sont qu'une approximation. Pour les obtenir, nous avons fait un certain nombre d'admissions, notamment que

- 1) les valeurs de Z_1 sont proportionnelles à la valeur réelle ;
- 2) la moyenne des résultats obtenus par polarographie et la méthode Rochat pour des échantillons de sang alcoolisés in vivo, présente la même erreur que la "valeur réelle" des échantillons alcoolisés in vitro.

Nous sommes persuadés qu'avec certaines de ces méthodes contrôlées, on arrive à de meilleurs résultats à condition que l'analyste soit spécialisé pour "son" dosage ou qu'il y ait introduit des mesures de sécurité qui n'y sont pas comprises. Mais nous ne pensons pas qu'une telle méthode doit être recommandée pour un emploi général.

Résumé.-

Nous avons contrôlé 4 méthodes de détermination de l'alcoolémie et 2 méthodes de dosage de l'éthanol dans l'haleine. Nous avons obtenu des données qui permettent de juger ces méthodes au point de vue précision, exactitude et sélectivité.

Nous avons proposé 3 méthodes de dosage dans le sang dont les laboratoires pourraient choisir suivant les appareils de dosage physico-chimiques qui sont à leur disposition. Nous avons introduit un procédé d'oxydation de l'alcool si sélectif que l'acétone ne gêne pas. Enfin, toutes ces méthodes ont été comparées entre elles.

5.- L I T T E R A T U R E

- 1) Cotte.- Répert. de Pharm. 9, 438 (1852) ;
Chem. Zeitschr. 21, 254 (1908).
- 2) Béchamp.- C.R. Acad. Sci., 61, 374 (1858) ;
Do. 89, 579 (1879).
- 3) Lallemand, Duroy et Perrin.- Ann. Hyg. Publ. Méd. Lég. 15,
232 (1860).
- 4) Bodländer.- Pflug. Arch., 32, 398 (1883).
- 5) Nicloux.- C.R. Soc. Biol. 48, 841 (1896) ; 41, 476 (1904) ;
Bl. Soc. Chim. biol. 13, 857 (1931) ;
Ann. Méd. Lég. 16, 113 (1936).
- 6) Schwarz et Thélin.- Rev. méd. Suisse rom. 60, 293 (1940).
- 7) Rochat.- Rev. méd. Suisse rom. 69, 65 (1949) et 70 (1950).
- 8) Communication No 11/54 de la Jurist. Zentrale des allg. Deut-
schen Automobil-Club (1.2.1954).
- 9) Klein.- Die Medizinische, 5, 173 (1955).
- 10) Borgmann.- Der Med. Sachverständige, 8, 141 (1955).
- 11) Linder.- Statist. Meth. Verl. Birkhäuser Basel (1951).
- 12) Naville.- Revue Criminol. 1, 1 (1947).
- 13) Schwarz.- Deutsche Z. gerichtl. Med. 10, 377 (1927).

- 14) Wehrli.- Mitteilg. Lebensmittelunters.u. Hyg. 45, 123 (1954).
- 15) Rochat.- Helv. Chim. A., 29, 102, 819 (1946).
- 16) Schifferli.- Praxis, 22 (1949) et Praxis, 34 (1951).
- 17) Bonnichsen et Theorell.- Scand. J. of clin. lab. Invest. 3,
58 (1951).
- 18) Bücher et Redetzki.- Klin. Wschr. 29, 615 (1951).
- 19) Dotzauer, Redetzki, Johannsmeier et Bücher.- Dtsche Z. gerichtl.
Med., 41, 15 (1952).
- 20) Redetzki, Johannsmeier et Dotzauer.- Dtsche Z. gerichtl. Med.,
41, 424 (1952).
- 21) Redetzki et Johannsmeier.- Archiv. f. Toxikologie, 16, 73
(1956).
- 22) Cordebard.- Bull. Soc. Chim. France (5) 5, 959 (1938).
- 23) Thivolle et Sonntag.- Bull. Soc. Chim. biol. 21, 1369 (1939).
- 24) Nicloux.- C.R. Soc. Biol. 74, 267 (1937).
- 25) Lingane et Kolthoff.- J. Amer. chem. Soc. 62, 852 (1940).
- 26) Thanheiser et Willems.- Arch. Eisenhüttenw. 13, 73 (1939).
- 27) Kirk.-"Quant. Ultramicroanalysis" (J. Wiley, New York) pg.
113 (1951).
- 28) MacLeod.- J. biol. chem. 181, 323 (1949).
- 29) Winnick.- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 523. (1942).
- 30) Hinsberg.- Handb. physiol. u. path. chem. Anal. V, 1 (1953).
- 31) Harger, Forney, et Baker.- Quart. J. studies on Alcohol, 17,
No 1 (1956).
- 32) Monnier et Fasel.- Mitteilg. Lebensmittelunters. u. Hyg. 47,
141 (1956).
- 33) Englis et Wollerman.- Anal. Chemistry, 24, 1905 et 1983 (1952).

